



**ELSA MARINA
DA SILVA
GONÇALVES**

**SCAFFOLDS INTELIGENTES E REFORÇADOS PARA
MEDICINA REGENERATIVA ÓSSEA**



**ELSA MARINA
DA SILVA
GONÇALVES**

**SCAFFOLDS INTELIGENTES E REFORÇADOS PARA
MEDICINA REGENERATIVA ÓSSEA**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Margarida Amaral estagiária de pós-doutoramento do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica e sob a coorientação da Doutora Mercedes Vila, investigadora principal da Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid.

A tudo o que me faz feliz!

o júri

presidente

Prof. Doutor José Maria da Fonte Ferreira

Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques

Equiparada a investigadora auxiliar na Universidade de Aveiro

Doutora Margarida Isabel dos Santos Amaral

Estagiária de pós-doutoramento na Universidade de Aveiro

Doutora Mercedes Vila Juárez

Investigadora principal na Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid

agradecimentos

Queria deixar expresso os meus agradecimentos às várias pessoas que, de forma direta ou indireta, me ajudaram durante este trabalho.

À minha orientadora, Margarida Amaral, por ter tido a paciência de me acompanhar durante todo este tempo.

À minha coorientadora, Mercedes Vila, pela ajuda científica, por me ter proporcionado a realização deste projeto e ainda por me ter acolhido em Madrid, onde foi realizada a parte inicial do trabalho.

Ao Professor Rui Silva pelo apoio na viagem a Madrid pois sem ele, este trabalho não teria sido possível.

Ao Doutor Miguel Ângelo e ao Doutor Filipe Oliveira pela ajuda nos estudos de caracterização elétrica e mecânica, respetivamente.

À Doutora Maria Helena Fernandes pela disponibilidade e por todo trabalho realizado na caracterização biológica.

Aos meus amigos, por serem o meu incentivo e a minha alegria nos bons e nos maus momentos.

Aos meus colegas de laboratório, pela camaradagem demonstrada durante todo este tempo.

Aos meus pais e à minha família, que apesar de todas as tristezas e dificuldades, me proporcionaram esta oportunidade, apoiando-me constantemente ao longo de todo este tempo. Um agradecimento especial ao meu sobrinho por todos os sorrisos e brincadeiras.

Ao pessoal técnico dos laboratórios dos departamentos de engenharia de materiais e cerâmica, de química e de física, pelo apoio prestado em todos os processos de análises

palavras chave

Scaffolds de regeneração óssea, hidroxiapatite, policaprolactona, nanotubos de carbono, impressão 3D, estimulação eléctrica.

resumo

Com o aumento da esperança média de vida no ser humano vem também o aumento das doenças degenerativas do tecido ósseo, contribuindo para o aumento dos procedimentos de reparação, nomeadamente os de enxertia óssea. Assim, torna-se importante a procura de biomateriais que possam cumprir os requisitos para proceder aos tratamentos necessários neste âmbito. Este estudo teve por base a construção de *scaffolds*, combinando três materiais com propriedades bem conhecidas, com o objetivo de congregar num único material as propriedades de todos eles. Os materiais escolhidos foram então a policaprolactona (PCL), a hidroxiapatite (HAp) e nanotubos de carbono (CNTs).

Para método de produção dos *scaffolds* foi escolhida a impressão 3D, uma vez que permitiu controlar parâmetros como porosidade, tamanho e forma da amostra.

Como métodos de caracterização dos compósitos foram efetuadas análises morfológicas, físico-químicas e biológicas.

As análises químicas confirmaram que os compostos dos *scaffolds* se encontravam bem aderidos e não reagiram entre si.

A morfologia e estrutura avaliadas através de microscopia ótica e eletrónica de varrimento revelaram a geometria quadrada dos poros com tamanho entre 450 e 700 µm, com uma completa interconectividade entre eles.

Como resultados da caracterização elétrica, verificou-se que, com o aumento da quantidade de CNTs introduzidos, houve uma diminuição da resistência elétrica do material, indicando que os *scaffolds* se tornaram condutores elétricos, podendo vir a ser utilizados na estimulação elétrica celular.

A incorporação de CNTs nos *scaffolds* não revelou ser benéfica na melhoria das propriedades mecânicas dos mesmos no entanto, os seus valores estão todos dentro dos parâmetros para aplicações no osso trabecular.

Relativamente às caracterizações biológicas, os *scaffolds* produzidos apresentaram propriedades bioativas, após estudos em fluido corporal simulado.

Por fim, foram realizados estudos preliminares de adesão celular *in vitro* que evidenciaram adesão das células osteoblásticas a todos os materiais produzidos, apresentando estas uma melhor adesão nos *scaffolds* que contém 10% de CNTs na sua composição.

Até à data, os resultados obtidos revelam que os *scaffolds* produzidos podem vir a ser promissores no campo da medicina regenerativa óssea.

keywords

Scaffolds for bone regeneration, hydroxyapatite, polycaprolactone, Carbon nanotubes, 3D printing, electrical stimulation.

abstract

With the increase of human life expectancy the number of bone tissue degenerative diseases has also increased, which contributes to increased repair procedures, including bone grafting. Therefore, it is important to search for biomaterials that can fulfill the requirements to carry out the necessary treatment in this context.

This study was based on the composite scaffolds development, combining three materials with well-known properties, with the aim of, together, bringing a unique material with properties of all of them. The materials chosen were then polycaprolactone (PCL), hydroxyapatite (HAp) and carbon nanotubes (CNTs).

The chosen producing method of scaffolds was the rapid prototyping system of direct printing, because it allowed control parameters such as porosity, size and shape of the sample.

Composites characterization was performed using morphological, physico-chemical and biological analysis.

The morphology and structure accessed by optic and electronic scanning microscopy revealed the square geometry of the pores, with size between 4500 and 700 μm with a complete interconnectivity between them.

As a result of the electrical characterization, it was found that the increase of the introduced CNTs reduces the electrical resistance of the material, indicating that the scaffolds became electrical conductors and could be used in cellular electrical stimulation.

The incorporation of CNTs in scaffolds was not proved to be beneficial in the mechanical properties improvement. However, their values are all in the parameters for trabecular bone applications.

Regarding biological characterizations, the produced scaffolds showed bioactive properties after studies in simulated body fluid.

Finally, the preformed preliminary studies of in vitro cell adhesion showed that osteoblastic cells adhere to all produced materials, presenting a better adhesion on the 10% CNTs scaffolds.

To date, the results show that the produced scaffolds are promising in the field of the bone regenerative medicine.

Índice

Índice de figuras.....	I
Índice de tabelas.....	V
Abreviaturas.....	VII
Símbolos e unidades.....	IX
Introdução.....	XI
Capítulo I - Revisão Bibliográfica	1
1. Tecido ósseo	1
1.1. Organização do tecido ósseo	2
1.2. Componentes celulares do osso.....	5
1.3. Fisiologia do osso.....	7
1.3.1. Remodelação óssea	7
1.3.2. Reparação de fraturas	9
1.4. Propriedades mecânicas do tecido ósseo.....	10
2. Scaffolds de regeneração óssea.....	11
2.1. Biomateriais utilizados em scaffolds para tecido ósseo	14
2.1.1. Polímeros.....	15
2.1.1.1. Policaprolactona (PCL).....	17
2.1.2. Biocerâmicos	18
2.1.2.1. Hidroxiapatite nanocristalina substituída com silício	18
2.1.3. Nanotubos de carbono (CNTs).....	19
2.1.3.1. Biocompatibilidade e toxicidade dos CNTs	21
2.1.4. Scaffolds compósitos	24

2.2.	Técnicas de fabrico de scaffolds - tradicionais vs avançadas	25
3.	Electroestimulação das células ósseas.....	31
	Capítulo II - Procedimento e técnicas experimentais.....	36
1.	Matérias-primas.....	38
2.	Preparação dos scaffolds	38
2.1.	Preparação da pasta	38
2.2.	Impressão dos scaffolds	40
3.	Técnicas de caracterização utilizadas.....	41
3.1.	Difração de raios X	41
3.2.	Análises térmicas diferencia e termogravimétrica (DTA/TG).....	42
3.3.	Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)/ espectrometria de energia dispersiva (EDS).....	43
3.4.	Microscopia eletrónica de transmissão - TEM.....	43
3.5.	Espetroscopia Raman	44
3.6.	Porosimetria por intrusão de mercúrio/ azoto - N ₂	44
3.7.	Resistência mecânica à compressão.....	45
3.8.	Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR)	47
3.9.	Propriedades elétricas	47
3.10.	Estudos de bioatividade.....	49
3.10.1.	Preparação da solução de fluido corporal simulado - SBF.....	49
3.10.2.	Ensaio de imersão	51
3.10.3.	Caracterização do SBF residual após os ensaios de imersão por espectroscopia de emissão de plasma induzido (ICP).....	52
3.11.	Testes de biocompatibilidade celular	52
	Capítulo III - Resultados e discussão	55
1.	Caracterização morfológica e estrutural.....	57
1.1.	Análises de SEM, TEM e de porosimetria	57

2.	Caracterização composicional	64
2.1.	Análise de DRX	64
2.2.	Análise da espectroscopia FTIR	65
2.3.	Análise da espectroscopia Raman.....	69
3.	Caracterização Física	73
3.1.	Análises térmicas diferencial e termogravimétrica simultâneas (DTA/TG) ..	73
3.2.	Propriedades elétricas	75
3.3.	Propriedades mecânicas	78
4.	Caracterização biológica.....	80
4.1.	Estudos de bioatividade.....	80
4.2.	Estudos preliminares de adesão celular	83
	Conclusões	93
	Propostas de trabalho futuras	95
	Bibliografia	97

Índice de figuras

Fig. 1 - Corte histológico de um osso, mostrando a estrutura do osso cortical (compacto) e do osso esponjoso (trabecular)[1].	2
Fig. 2 - Osso longo parcialmente seccionado. Adaptado de [4].....	3
Fig. 3 - Histologia do osso esponjoso. Adaptado de [4].....	4
Fig. 4 - Histologia do osso compacto. Adaptado de [4].	5
Fig. 5 - Células ósseas. Adaptado de [4].....	6
Fig. 6 - Ciclo de remodelação óssea. Adaptado de [10].	8
Fig. 7 - Esquema ilustrativo do processo de reparação de uma fratura no tecido ósseo. Imagens adaptadas de [4].	9
Fig. 8 - Unidade de repetição da PCL [20].	17
Fig. 9 - Figura Diagrama de SWCNT (A) e de MWCNT (B) mostrando as dimensões típicas de comprimento, largura e distância entre paredes dos MWCNT.[40]	20
Fig. 10 - Imagens de fotografias de pulmões de ratos e de microscopia do tecido pulmonar. As imagens (A) e (B) correspondem aos ratos de controlo sem exposição aos CNTs e as imagens (C) e (D) após a exposição aos CNTs. Verifica-se que na imagem (C) os pulmões apresentam uma modificação da sua aparência quando comparados com a imagem (A). Na imagem (D) verifica-se a existência de granulomas a envolverem os CNTs (partículas pretas). Imagens adaptadas de [54].	22
Fig. 11 - Imagem ilustrativa do método de PR para aplicações biomédicas. Adaptado de [85].	26
Fig. 12 - Dispositivo de impressão de modelagem por deposição de material fundido. Adaptado de [86]	27
Fig. 13 - Esquema de um equipamento de impressão 3D. Adaptado de [86]	28

Fig. 14 - Representação esquemática de um equipamento de sinterização seletiva a laser. Adaptado de [86].	28
Fig. 15 - Esquema representativo de um equipamento de estereolitografia. Adaptado de [86].	29
Fig. 16 – Ilustração esquemática de um conjunto de distribuição pneumática (A) e esquema da dispensa da pasta camada a camada (B). Adaptado de [85,88].	29
Fig. 17 - Esquema ilustrativo dos diferentes métodos de estimulação elétrica que utilizam diferentes fontes de corrente (a) corrente contínua, (b) corrente alternada (c) corrente pulsada. Adaptado de [92].	31
Fig. 18 - Ilustração esquemática de um sistema de estimulação elétrica, mostrando as placas de cultura, o conjunto de eletrodos colocados dentro da incubadora e o gerador de corrente [93].	32
Fig. 19 - Esquema resumo para os mecanismos de ação da corrente elétrica propostos. Adaptado de [91].	33
Fig. 20 – Diagrama do procedimento experimental realizado.	39
Fig. 21 - Equipamento de prototipagem rápida e bisel de impressão utilizado.	40
Fig. 22 – Imagens dos <i>scaffolds</i> obtidos. Desenho técnico dos <i>scaffolds</i> (A), simulação 3D no <i>software Solidworks</i> (B) a (D) e imagens reais das amostras com 2%CNTs na sua composição (E) e (F).	41
Fig. 23 – Dispositivo de compressão utilizado nos ensaios e figuras ilustrativas de um ensaio de compressão.	46
Fig. 24 – Esquema do circuito efetuado para a medição elétrica nas amostras.	48
Fig. 25 – Diagrama ilustrativo do procedimento utilizado nos estudos de bioatividade.	51
Fig. 26 - Micrografias obtidas dos diferentes <i>scaffolds</i> produzidos.	58
Fig. 27 – Micrografias de SEM das regiões de fratura dos <i>scaffolds</i> produzidos.	59
Fig. 28 – Espectro de EDS e regiões de aquisição num <i>scaffold</i> com 4,5 % de CNTs na sua composição.	60
Fig. 29 - Micrografias de TEM (A, B e C) e padrão de difração eletrônica da HAp (D).	61
Fig. 30 - Gráfico representativo das medidas de porosimetria nos <i>scaffolds</i> de HA/PCL.	62

Fig. 31 - Gráfico representativo das medidas de porosimetria em todos os <i>scaffolds</i> de HA/PCL/CNTs.....	62
Fig. 32 - Isotérmica de adsorção – dessorção representativa dos compósitos de HA/PCL/CNTs.	63
Fig. 33 – Difractogramas de raios-X dos materiais utilizados no fabrico dos <i>scaffolds</i>	64
Fig. 34 - Espectros de DRX dos <i>scaffolds</i> compósitos. + - PCL, 0 – CNTs, * - HAp.	65
Fig. 35 - Espectro de FTIR da HAp.	66
Fig. 36 - Espectro de FTIR da PCL.	67
Fig. 37 – Espectro de FTIR relativo aos CNTs purificados e funcionalizados com o grupo COOH.....	68
Fig. 38 - Espectro de FTIR da estrutura compósita de 4,5% de CNTs.	69
Fig. 39 - Espectro de Raman da HAp	70
Fig. 40 - Espectro de Raman da PCL	70
Fig. 41 - Espectro de Raman dos CNTs utilizados, purificados e funcionalizados com o grupo –COOH.....	71
Fig. 42 - Espectro Raman de diferentes zonas do compósito de composição 10 % CNTs. # - HAp, + - PCL e X- CNTs.....	71
Fig. 43 - Análise termogravimétrica da PCL para a composição com 0%CNTs.	73
Fig. 44 - Análises termogravimétricas para a temperatura de degradação da PCL e CNTs. (A) 0,75%CNTs (B) 2%CNTs (C) 4,5%CNTs (D) 10%CNTs.	74
Fig. 45 - Gráficos tensão/corrente para as amostras (A) 0,75% CNTs, (B) 2% CNTs, (C) 4,5%CNTs e (D) 10% CNTs.	76
Fig. 46 - Representação gráfica dos valores de resistência obtidos nas medidas elétricas.	77
Fig. 47 - Gráfico ilustrativo das curvas de tensão/deformação obtidas para a composição de 0%CNTs.	79
Fig. 48 - Gráfico ilustrativo das curvas de tensão/deformação obtidas para todos os <i>scaffolds</i> com CNTs na sua composição.	79

Fig. 49 - Evolução da concentração iônica em Ca e P no SBF durante o ensaio de bioatividade.	81
Fig. 50 - Micrografias de SEM obtidas para as amostras de composição 2% de CNTs imersas em SBF por 21 dias.	82
Fig. 51 - Espectro de bioatividade de vários implantes biocerâmico relativamente à taxa relativa de bioreactividade (a). (A) 45S5 Bioglass® (B) KGS Ceravital® (C) 55S4.3 Bioglass® (D) A/W vidro-cerâmico (E) HA (F) KGX Ceravital ® e (G) Al ₂ O ₃ -Si ₃ N ₄ . Adaptado de [33].	83
Fig. 52 - Imagens de SEM das amostras antes dos ensaios biológicos. ★ - Áreas com CNTs.	84
Fig. 53 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos <i>scaffolds</i> de 0% de CNTs.	85
Fig. 54 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos <i>scaffolds</i> de 0,75% de CNTs.	86
Fig. 55 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos <i>scaffolds</i> de 2% de CNTs.	87
Fig. 56 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos <i>scaffolds</i> de 4,5% de CNTs.	88
Fig. 57 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos <i>scaffolds</i> de 10% de CNTs.	89
Fig. 58 - Imagem de maior ampliação do scaffold com 10% de CNTs ao dia 1 de cultura. ★ - Regiões que contêm CNTs.	90

Índice de tabelas

Tabela 1 - Valores das propriedades mecânicas do osso [14].	10
Tabela 2 - Polímeros naturais e sintéticos usados em <i>scaffolds</i> de regeneração óssea. Adaptado de [5]	16
Tabela 3 - valores das propriedades mais relevantes dos MWCNTs.	21
Tabela 4 – Matérias-primas utilizadas.....	38
Tabela 5 – Tabela descritiva das composições preparadas.	39
Tabela 6 - Ordem, quantidade, fornecedor e pureza dos reagentes usados para a preparação de 1L de SBF.....	50
Tabela 7 - Concentração de íões no plasma humano e no SBF [67].....	50
Tabela 8 - Bandas de infravermelhos, características da HAp.....	66
Tabela 9 - Bandas de infravermelhos (IV), características da PCL [72].	67
Tabela 10 - Bandas de infravermelhos dos CNTs.....	68
Tabela 11 – Valores de resistência obtidos para cada tipo de composição.....	77
Tabela 12 – Valores de resistência à compressão para as diferentes amostras de cada composição.	78

Abreviaturas

alfa-MEM – *alfa-minimum essential medium*.

BET – *Brunauer. Emmet and Teller*.

BMP - proteínas ósseas morfogenéticas.

CAD – *Computer aided design*.

CAM – *computer assisted manufacturing*.

CNTs – Nanotubos de carbono.

DRX – difratometria de raios-X.

DTA – análise térmica diferencial.

EDS – difratometria de elétrons secundários.

EDTA – etileno-diamina-tetra-acético.

F_{máx} – tensão nominal.

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

HAp – Hidroxiapatite.

ICP – espectroscopia de emissão por plasma induzido.

IV – infravermelho.

N₂ – Azoto.

PBS – *phosphate buffered saline*.

PCL – Policaprolactona.

PLA – *Poly lactid Acid*.

PR – Prototipagem rápida.

RC – resistência à compressão.

SBF – plasma humano simulado.

SEM – microscopia electrónica de varrimento.

TAC – Tomografia axial computadorizada.

TEM – microscopia electrónica de transmissão.

TG – análise termogravimétrica.

Símbolos e unidades

μ - micron.

A – Ampere.

A – área.

A_0 – área inicial.

F – força aplicada.

g – grama.

h – altura.

kV – kilovolt

L – litro.

M – mega.

m – metro.

mA – miliampere.

mg – miligrama.

mL- mililitro.

mm – milímetro.

mM – milimol.

nm – nanómetro.

Pa – pascal.

s –segundos.

Sa – área de superfície aparente.

V – Volts.

Vs – volume de solução.

Å – ångström.

ε – extensão nominal.

ζ – potencial zeta.

λ - comprimento de onda.

σ – Tensão.

σ – Tensão nominal.

Ω – ohm.

Introdução

Não obstante à existência de enormes progressos no campo da medicina regenerativa óssea ao longo dos anos, existem ainda muitas limitações nas terapias atuais de implantação de enxertos ósseos naturais ou sintéticos. Neste nível, os avanços oferecidos pela investigação ao nível das ciências dos materiais têm levado, claramente, a melhorias no campo da substituição óssea, no que aos materiais sintéticos diz respeito. Porém, ainda não foi desenvolvido nenhum material que seja perfeitamente adequado e portanto, os defeitos de dimensões significativas representam ainda um grande desafio para os ortopedistas e cirurgiões de medicina reconstrutiva.

É neste contexto que tem vindo a emergir o desenvolvimento de novos materiais em combinação com a engenharia de tecidos, como uma alternativa válida para os atuais tratamentos de substituição e regeneração óssea. Em contraste com a abordagem clássica do biomaterial, a combinação dos materiais com elementos celulares baseia-se no âmbito da pré-formação de tecido a regenerar, visando a indução dos novos tecidos funcionais, ao invés de apenas implantar novas peças de reposição.

Este trabalho tem como objetivo estudar o desenvolvimento de *scaffolds* condutores elétricos de regeneração de tecido ósseo. Estes são constituídos por hidroxiapatite nanocristalina dopada com silício, policaprolactona e por diferentes proporções de nanotubos de carbono que, além de terem o principal propósito de funcionar como fase de reforço, conferem também condutividade elétrica ao compósito. A técnica de produção utilizada foi a de prototipagem rápida por impressão direta. Produziram-se *scaffolds* com e sem nanotubos de carbono (CNTs) mantendo-se como material base a hidroxiapatite (HAp) e a policaprolactona (PCL). As percentagens de CNTs utilizadas variaram entre os 0,75 e os 10% em peso.

Com esta combinação de materiais, pretende-se a obtenção de um scaffold que reúna as seguintes propriedades: bioatividade, biocompatibilidade, propriedades mecânicas compatíveis com o osso, condutividade elétrica para estimulação celular e propriedades morfológicas adequadas que cumpram os requisitos para o tecido em questão, tais como a porosidade e o tamanho de poro.

O trabalho está estruturado em quatro capítulos: revisão bibliográfica, procedimento e técnicas experimentais, resultados e discussão e para finalizar, as conclusões e propostas para trabalhos futuros. No capítulo inicial são expostos os conceitos teóricos fundamentais, essenciais para o fundamento da discussão e entendimento da parte experimental efetuada. No capítulo II é feita a apresentação e explicação dos procedimentos experimentais, incluindo procedimentos de caracterização das amostras finais. Na terceira parte do trabalho são apresentados os resultados obtidos e a discussão dos mesmos e por último, são apresentadas algumas conclusões fundamentais retiradas de todo o trabalho.

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

Tendo este trabalho como objetivo conceber e fabricar *scaffolds* para regeneração de tecido ósseo, é de alguma importância fazer uma revisão sobre a composição, estruturas e mecanismos fisiológicos associados a este tipo de tecido, assim como as técnicas e os materiais utilizados no fabrico de *scaffolds*. Paralelamente, será também abordada a promoção do crescimento ósseo através da aplicação de estímulos elétricos. Esta surge porque a pesquisa sobre a “bioelectricidade” no osso entre os anos 40 e 60 do século XX deu origem às várias descobertas sobre a indução do crescimento ósseo que, por sua vez, fizeram emergir materiais “inteligentes” para acelerar a regeneração óssea.

1. Tecido ósseo

O tecido ósseo consiste num tipo especializado de tecido conjuntivo rígido, dinâmico, altamente vascularizado, com a capacidade contínua de regeneração e remodelação sem a formação de tecido cicatricial, mesmo na idade adulta [1]. Este possui diversas funções fundamentais, como é o caso da proteção dos órgãos vitais internos, do suporte estrutural do corpo, assim como o auxílio no movimento resultante da sua ligação com o tecido muscular. Possui também a função de produção e alojamento de células progenitoras (hematopoiéticas e mesenquimais) e de depósito mineral. Nesta última função, o osso funciona como um tecido inteligente que responde às necessidades metabólicas correntes, mantendo a homeostase mineral e o balanço ácido-base, ou seja, é capaz de mobilizar rapidamente os minerais armazenados em caso de carência, ou acumulá-los quando estes estão em excesso [2,3,4].

À semelhança dos outros tecidos conjuntivos, o tecido ósseo contém uma matriz extracelular abundante que circunda as células e as mantém separadas. A matriz extracelular do tecido ósseo pode ser caracterizada como um material compósito natural que contém 10% de água, 20% de matéria orgânica e 70% de fase mineral. A fase ou matriz orgânica é constituída maioritariamente por fibras de colagénio do tipo-I (95%) e por uma pequena quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas, podendo estas últimas ter funções na mineralização da matriz. Quanto à fase mineral, esta é composta na sua maioria por hidroxiapatite (HAp), um fosfato de cálcio com a composição

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A HAp encontra-se fundamentalmente na forma de cristais com 40 nm de comprimento, 5 a 20 nm de largura e 1,5 a 3 nm de espessura, depositados regularmente de 60 em 60 nm ao longo da fibra de colagénio. Cada cristal encontra-se rodeado por um revestimento aquoso, que permite a troca de iões entre os cristais e o fluido extracelular. Além da HAp, a matriz mineral contém também iões de bicarbonato, magnésio e citrato em pequenas quantidades [1,5,6]

1.1. Organização do tecido ósseo

O tecido ósseo maduro pode ser classificado, com base na sua organização macroestrutural, como esponjoso ou trabecular e cortical ou compacto (Fig. 1) sendo a sua percentagem no esqueleto adulto cerca de 80% e 20% respetivamente [2]. O osso cortical é denso, sólido e homogéneo, com apenas 10% de porosidade e em que não se observam lacunas à vista desarmada, localizando-se parte óssea externa a rodear a área da medula óssea. Já o osso trabecular pode ser entre 50 a 90% poroso e é composto por uma rede de trabéculas irregulares de tecido ósseo, semelhantes a favos de mel. [3,5].

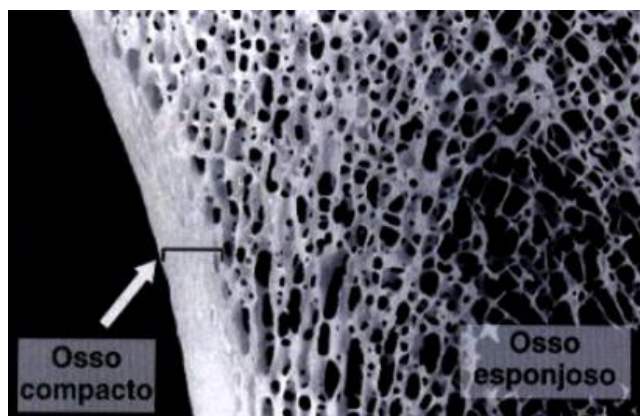


Fig. 1 - Corte histológico de um osso, mostrando a estrutura do osso cortical (compacto) e do osso esponjoso (trabecular)[1].

As percentagens de osso cortical e trabecular diferem ao longo do esqueleto. No caso dos ossos longos, estes são divididos em três secções: a epífise, a metáfise e a diáfise, como ilustra a Fig. 2. As epífises são as extremidades dos ossos longos e são

constituídas por osso esponjoso, coberto por uma fina camada de osso compacto que, por sua vez está revestida por cartilagem hialina especializada, formando a cartilagem articular. A metáfise corresponde à região de transição que junta a diáfise com a epífise, é a responsável pelo crescimento aposicional (em comprimento). A diáfise é a porção média do um osso longo, composta por osso cortical e geralmente, contém medula óssea e tecido adiposo [1, 3].

A nível macroscópico, pode também ser observado que as superfícies externa e interna dos ossos longos, exceto nas cavidades articulares, são revestidas por uma camada de tecido conjuntivo chamada de periósteo e endósteo, respetivamente. Estas membranas têm particular importância, pois possuem como função alojar as células osteoprogenitoras, suprimento sanguíneo do tecido ósseo e auxiliar no processo de reparação óssea após uma lesão [1,3].

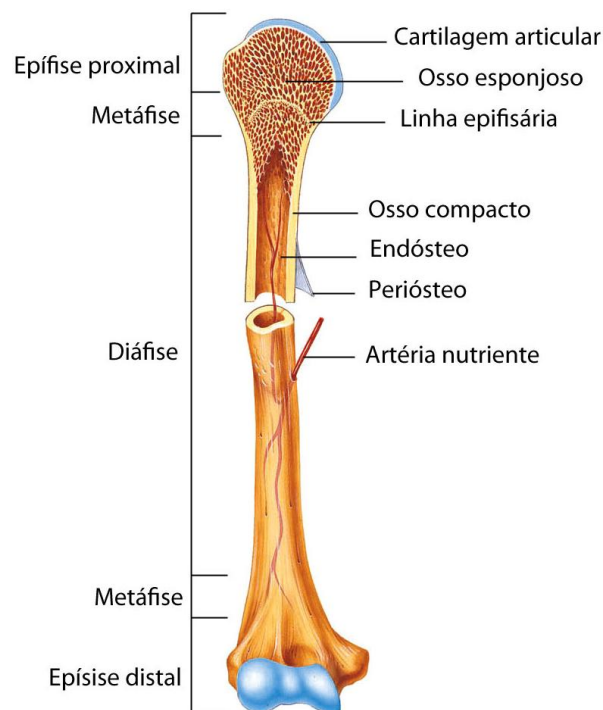


Fig. 2 - Osso longo parcialmente seccionado. Adaptado de [4].

Microestruturalmente, o tecido ósseo esponjoso é formado por trabéculas constituídas por lamelas ósseas, na sua maioria paralelas entre si, circunscrevendo cavidades

intercomunicantes, preenchidas no osso vivo por medula óssea. As trabéculas estão organizadas sob a forma de uma rede tridimensional, que confere ao osso esponjoso uma ótima resistência às cargas transmitidas pelas superfícies articulares (Fig. 3).

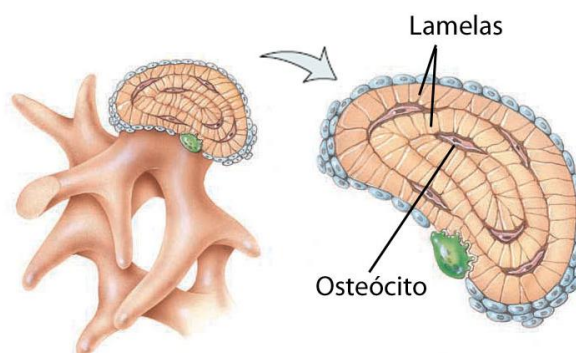


Fig. 3 - Histologia do osso esponjoso. Adaptado de [4].

Quanto à microestrutura do tecido ósseo cortical (Fig. 4) este possui como estrutura elementar o osteónio ou sistema de Havers, constituído por colunas cilíndricas, exteriormente demarcadas por uma linha mineralizada, designada por linha cimentante. Todos os osteónios estabelecem ligação entre si através de canais perpendiculares, os canais de Volkmann, que asseguram a nutrição e difusão de células ósseas.

Cada osteónio é formado por cerca de 5 a 15 lamelas ósseas concêntricas, dispostas à volta de um canal central, o canal de Havers, que é revestido por endóstio e ocupado por elementos vasculo-nervosos. As lamelas ósseas apresentam uma orientação perpendicular entre si, de modo a conferir maior resistência ao osso. Entre as lamelas encontram-se lacunas ósseas ocupadas pelos osteócitos, que estabelecem comunicação entre si através de prolongamentos citoplasmáticos dentro de canalículos ósseos que atravessam as lacunas [1,3,4].

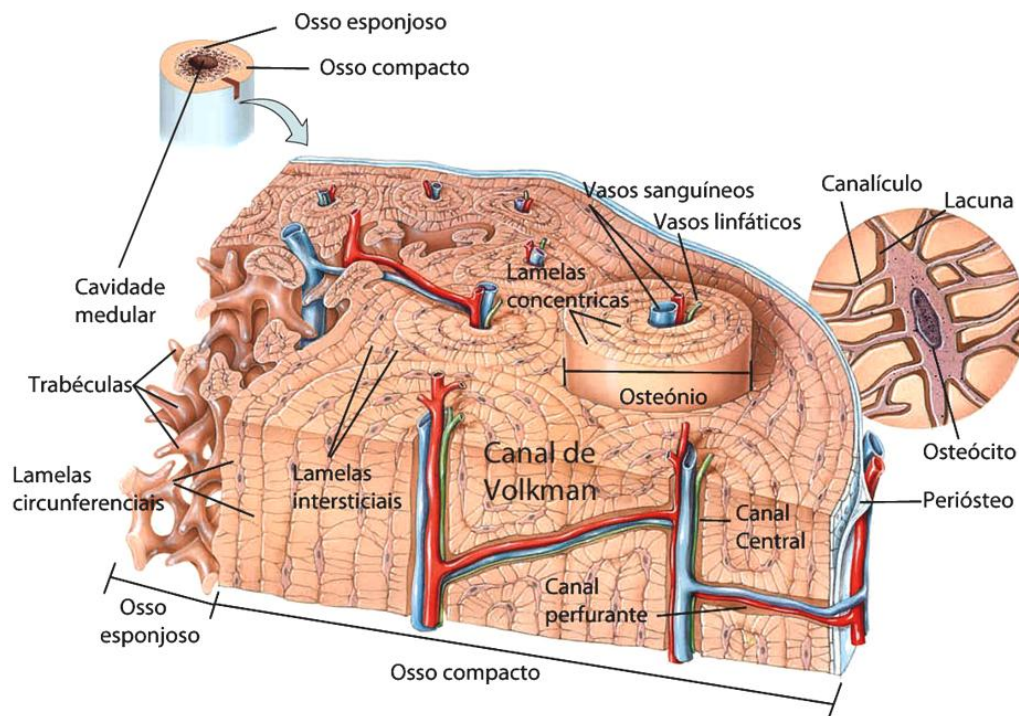


Fig. 4 - Histologia do osso compacto. Adaptado de [4].

1.2. Componentes celulares do osso

No tecido ósseo, evidenciam-se quatro tipos de células (Fig. 5) que entram ativamente na formação e remodelação óssea, sendo estes: os osteoblastos, os osteócitos, as células de revestimento ósseo (bone lining cells) e os osteoclastos.

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal, localizam-se na porção mais profunda do periosteio e endosteio na proximidade das regiões de tecido ósseo em formação. A sua forma varia consoante a sua atividade sintética, sendo cuboide quando em intensa atividade e achatada em estado pouco ativo. Estas células são as responsáveis pela síntese da componente orgânica da matriz óssea (colagénio tipo-I, proteoglicanos e glicoproteínas). Possuem também a capacidade de concentrar os fosfatos de cálcio, participando, assim na mineralização da matriz. À medida que vão produzindo componentes da matriz extracelular não calcificada – o osteóide – os

osteoblastos vão sendo envolvidos pelos seus próprios produtos de secreção. Durante a mineralização, os osteoblastos dão origem prolongamentos citoplasmáticos, dando origem aos canalículos e às lacunas, e é no seio destas últimas, que os osteoblastos vão ficar aprisionados passando a ser denominados de osteócitos [7].

Os osteócitos possuem uma forma achatada e, desta forma, são o resultado da diferenciação dos osteoblastos. São células metabolicamente ativas que também entram na síntese e mineralização da matriz óssea, mas acredita-se que a sua principal função é orientar a remodelação óssea, através da deteção de alterações na solicitação mecânica, um fenómeno conhecido por mecanotransdução [6,7].

As células de revestimento ósseo são células achatadas que se situam nas superfícies ósseas e desempenham papel na coordenação da reabsorção e formação óssea. Estas são o produto da involução dos osteoblastos que não ficaram aprisionados nas lacunas e não se diferenciaram em osteócitos, ou seja, o resultado da regressão dos osteoblastos não diferenciados. No entanto, estas células encontram-se em quiescência e podem ser revertidas à espécie anterior, se devidamente estimuladas [3,6,7].

Os osteoclastos derivam da célula hematopoiética. São células móveis e de grande dimensão (20 a 100 μm) responsáveis pela reestruturação ativa no interior do tecido ósseo, promovendo a remoção da matriz [3,7].

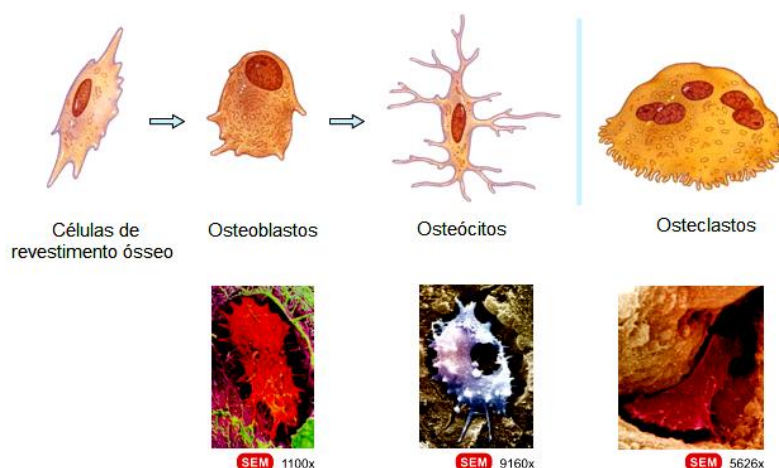


Fig. 5 - Células ósseas. Adaptado de [4].

1.3. Fisiologia do osso

A fisiologia do osso assenta em dois fenómenos principais:

- **Remodelação óssea** - substituição de tecido ósseo ao longo da vida;
- **Reparação de fraturas.**

1.3.1. Remodelação óssea

O osso é um tecido dinâmico que se encontra constantemente em renovação, através da sua formação e reabsorção, estimando-se que, anualmente em adultos, seja substituída 5 a 10% da massa óssea total. Este fenómeno controlado e equilibrado é denominado de remodelação e é necessário para que haja a manutenção e reparação de defeitos microestruturais, prevenindo a acumulação de microfissuras resultantes das solicitações mecânicas aplicadas. Assim é possível que o osso não acumule danos na sua estrutura, possibilitando o desempenho de todas as funções correntes sem qualquer problema. Além disso, este processo permite manter a homeostase do metabolismo fosfocálcico, repondo os níveis de cálcio no sangue [3,7–9]. Ao nível microscópico, a remodelação óssea é mediada pelos osteoclastos que vão reabsorvendo o osso mais antigo e os osteoblastos que formam o osteóide e o mineralizam, preenchendo a cavidade previamente criada pelos osteoclastos. Os osteócitos são igualmente importantes, uma vez que são sensíveis a estímulos mecânicos, vindo a proporcionar uma adaptação do osso às necessidades mecânicas vigentes [7,9].

O processo de remodelação óssea é um ciclo que pode ser dividido nas seguintes fases (Fig. 6):

- **Quiescência** – fase em que o osso se encontra em repouso.
- **Ativação** – consiste na ativação da superfície do osso antes da reabsorção, através da retração das células de revestimento ósseo (lining cells) e a digestão da membrana endóstea. Uma vez exposta, a superfície mineralizada atrai os osteoclastos circulantes, oriundos dos vasos adjacentes.

- **Reabsorção** - os osteoclastos, começam a dissolver a matriz mineral e a decompor a matriz óssea. O processo é concluído pelos macrófagos e facultam a libertação dos fatores de crescimento contidos dentro da matriz.
- **Formação** - nas áreas de reabsorção, vão-se acumulando células pré-osteoblásticas, atraídas pelos factores de crescimento libertados a partir da matriz, que atuam como agentes quimiotáticos e estimulam a sua proliferação. Os pré-osteoblastos sintetizam uma substância cimentante sobre a qual o novo tecido se liga, expressando proteínas ósseas morfogenéticas (BMP – bone morphogenetic proteins) que levam à sua diferenciação. Poucos dias depois, os osteoblastos já diferenciados, começam a sintetizar o osteóide que vai preenchendo as áreas reabsorvidas.
- **Mineralização** – esta fase começa trinta dias após a deposição do osteóide, cessando ao fim de 90 dias no osso trabecular e em 130 dias no osso cortical. Após a fase de mineralização começa novamente a fase de quiescência, até haver uma nova fase de ativação [10].

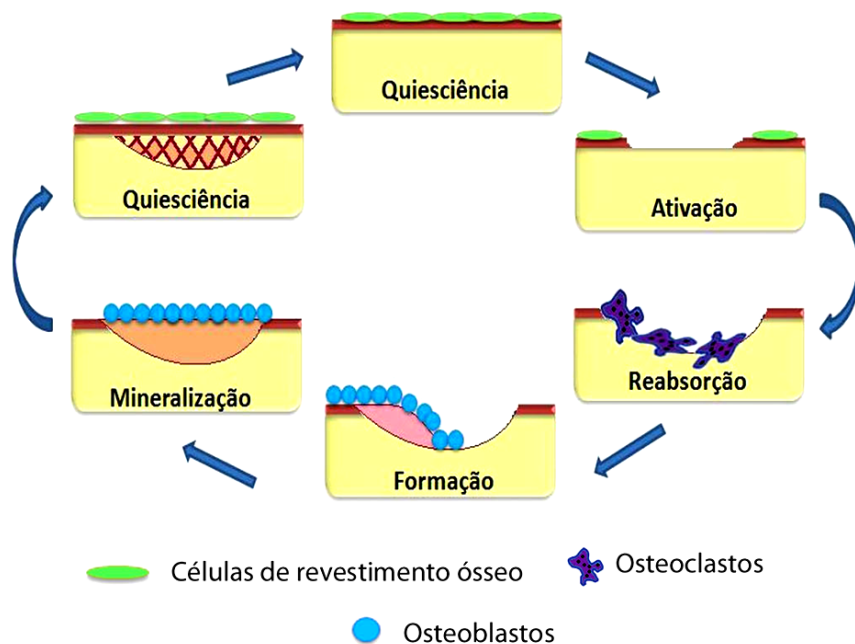


Fig. 6 - Ciclo de remodelação óssea. Adaptado de [10].

1.3.2. Reparação de fraturas

Apesar de o osso ser um tecido rígido é também suscetível a fraturas, sendo a sua cicatrização um dos mais admiráveis processos de reparação do corpo, uma vez que resulta não numa cicatriz, mas sim na verdadeira reconstituição do tecido danificado [7].

A reparação óssea pode, ser dividida nas seguintes fases sequenciais ilustradas na Fig. 7:

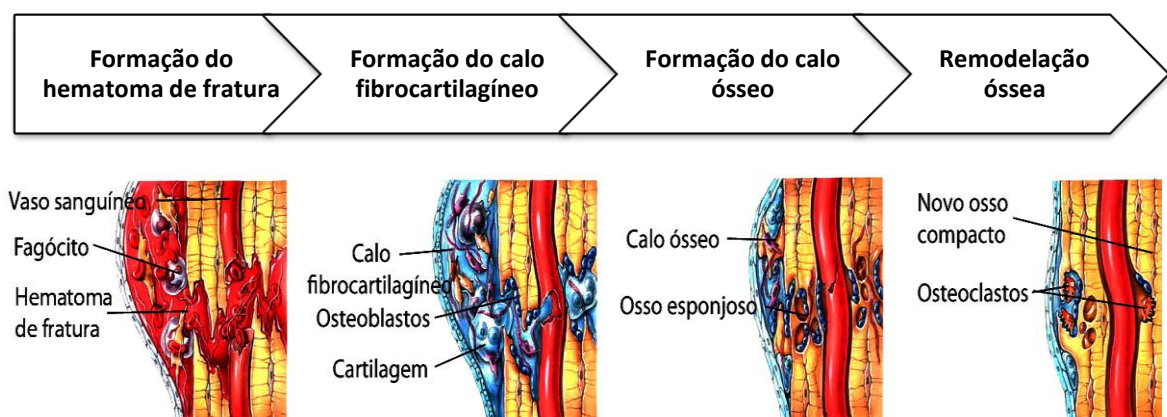


Fig. 7 - Esquema ilustrativo do processo de reparação de uma fratura no tecido ósseo. Imagens adaptadas de [4].

Inicialmente, a fratura é acompanhada de hemorragia formando-se um hematoma. As células do periósteo e endósteo respondem à lesão e existe uma rápida proliferação de fibroblastos que estão envolvidos na criação de cartilagem e fibrocartilagem, formando assim o calo fibrocartilaginoso que preenche a lacuna do tecido lesado. A partir do calo fibrocartilágneo, os osteoblastos começam a produzir a matriz óssea, levando ao desenvolvimento de um calo ósseo de tecido primário imaturo. Por fim, existe a remodelação do tecido ósseo primário em osso lamelar ou secundário [4,10,11].

1.4. Propriedades mecânicas do tecido ósseo

O osso é um material não homogêneo devido ao facto de ser constituído por várias substâncias orgânicas e inorgânicas, com diferentes propriedades mecânicas. A combinação da HAp com as fibras de colagénio é a principal responsável pelas propriedades do osso, contribuindo para a resistência e rigidez, conferindo-lhe, assim, a capacidade de suportar grandes cargas sem fraturar. Os cristais de HAp conferem uma grande capacidade de resistência à compressão, enquanto que as fibras de colagénio resistem às forças de tração [8].

Quando o tecido ósseo é submetido à ação de forças externas, a sua resposta vai variar de acordo com diversos fatores, tais como a condição do paciente (idade, género), a localização, tipo (compressão, tração e corte), a direção da carga aplicada (longitudinal, transversal) e a velocidade de aplicação [8].

É de salientar que *in vivo*, as forças a que os ossos são submetidos têm várias origens possíveis, tais como as cargas exercidas durante a marcha ou as forças de impacto devido a uma queda [13].

Os valores das propriedades mecânicas do osso cortical e trabecular encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores das propriedades mecânicas do osso [14].

Propriedade	Osso cortical	Osso trabecular
Resistência à compressão (MPa)	100-230	2-12
Resistência à tração (MPa)	50-150	10-20
Tenacidade à fratura (MPa m^{1/2})	2-12	NA

2. Scaffolds de regeneração óssea

O tecido ósseo possui funções essenciais no funcionamento do corpo humano e portanto, é de esperar que qualquer alteração existente na sua estrutura, devido a danos ou doença, altere drasticamente o equilíbrio corporal e a qualidade de vida.

O desenvolvimento de uma sociedade envelhecida, devido ao aumento da esperança média de vida, levou a um grave e significativo aumento no número de doenças músculo-esqueléticas. Na verdade, estas patologias tais como osteoartrite, osteoporose, traumatismos e outros tipos de doenças ósseas estão entre as maiores causas de sofrimento e dor aguda a longo prazo de centenas de milhões de pessoas em todo o mundo. Estima-se que mais de 100 milhões de europeus são afetados por problemas ósseos e espera-se que a percentagem da população afetada seja o dobro no ano de 2020. Desta forma, os tratamentos dos problemas ósseos representam um desafio médico e socioeconómico significativo [15].

Como foi descrito anteriormente, o osso tem a capacidade de autorregeneração espontânea. No entanto, isto só ocorre quando o tamanho da lesão é inferior ao tamanho crítico, ou seja, o menor tamanho para o qual não se irá regenerar espontaneamente durante a vida do doente. Quando as lesões estão acima do tamanho crítico, a autorregeneração não é possível, sendo necessário recorrer a terapias de substituição quer através de dispositivos físicos que substituem o osso, quer através de materiais utilizados para preencher a lesão e promover, assim, o crescimento do tecido ósseo [16–18].

No primeiro caso, ou seja, na utilização de dispositivos de substituição física, recorre-se à utilização de estruturas que têm como função a substituição total ou parcial de uma peça anatómica como é o caso das próteses. No entanto, este processo não promove o crescimento ósseo natural e não leva à cicatrização do tecido [18].

Os tratamentos baseados no preenchimento podem ser feitos recorrendo a tecido ósseo proveniente do organismo do próprio paciente (autoenxerto) ou de um dador (aloenxerto). Esta abordagem possui, porém, desvantagens, tais como o recurso a uma incisão para retirar apenas uma porção limitada de osso, no caso do autoenxerto; ou o perigo de complicações tais como a infeção e rejeição, no caso dos aloenxertos. Para contornar

esta abordagem tem-se apontado para o desenvolvimento e utilização de materiais processados laboratorialmente que possam substituir o osso natural [14].

Aos materiais artificiais utilizados no corpo humano dá-se o nome de biomateriais, podendo estes ser definidos como materiais processados pelo homem, de origem natural ou sintética, usados para substituir um tecido ou órgão, parcial ou totalmente a curto ou longo prazo [14,19].

Para entender o conceito de biomaterial é necessário referir que estes devem possuir como requisito essencial a **biocompatibilidade**. Esta é definida como a capacidade de um material desencadear no hospedeiro uma resposta apropriada, numa aplicação específica, ou seja, não deve causar qualquer reação tóxica ou imunogénica no local de implantação [20].

Os biomateriais podem ser divididos em classes de materiais sintéticos (metálicos, poliméricos e cerâmicos) e naturais (colagénio, amido, ácido hialurónico, etc.) que por sua vez podem ser divididos de acordo com a sua interação com o meio envolvente. Este conceito de interação dos materiais com o meio biológico foi evoluindo ao longo dos anos, sendo a sua classificação ordenada através de tipos de gerações, nomeadas como 1ª, 2ª e 3ª geração.

Na 1ª geração, os materiais para as aplicações biomédicas tinham como objetivo final alcançar uma combinação adequada de propriedades físicas para coincidir com as do tecido substituído tendo estes de ser inertes ou quase inertes para que interação entre os tecidos adjacentes fosse mínima [21].

Na 2ª geração começou a haver a preocupação de produzir materiais que interagissem com os tecidos circundantes (bioativos) ou que fossem reabsorvíveis. Estas características eram importantes para o material criar um vínculo com o tecido adjacente ou para este ser reabsorvido enquanto havia a regeneração [21].

Mais recentemente, têm vindo a desenvolver-se os chamados materiais de 3ª geração, desenhados com o intuito de estimular respostas celulares específicas que levem o tecido a autorregenerar-se, mantendo-se a bioatividade e a capacidade de reabsorção. Isto pode ser conseguido através da utilização de técnicas de engenharia de tecidos em conjunto com a engenharia de materiais, em que as células progenitoras são implantadas no interior de estruturas que possam levar à regeneração e mesmo à cura do tecido *in situ* [21].

Nesta linha de pensamento da utilização dos biomateriais de 3ª geração, no que à regeneração óssea diz respeito, a abordagem mais indicada é a utilização de modelos temporários – os *scaffolds*. Estes formam uma estrutura porosa tridimensional que vai permitir a estabilidade mecânica do local lesado e a migração, adesão e proliferação das células, essenciais à formação do tecido ósseo [22].

Existem alguns requisitos básicos que têm sido amplamente aceites e identificados como essenciais para a produção de *scaffolds* para tecido ósseo, sendo estes:

- **Biocompatibilidade.**
- **Osteocondução** - O *scaffold* deve conter uma rede de poros tridimensionais, interconectados, para promover a osteocondução, ou seja, este deve permitir a adesão, proliferação e migração celular e também a penetração de novos vasos, a difusão de nutrientes e a remoção dos resíduos metabólicos das células aderidas.
- **Tamanho de poro adequado** - este parâmetro é de extrema importância pois poros muito pequenos podem limitar a vascularização e impedir que as células entrem no *scaffold* e poros demasiado grandes podem resultar em crescimento anómalo de tecido e *scaffolds* fracos mecanicamente. Para os *scaffold* de regeneração óssea é recomendado que o tamanho de poro seja entre 1 e 300 µm para permitir boas condições de migração celular, vascularização e crescimento ósseo.
- **Osteointegração** – o *scaffold* deve promover a formação de um vínculo com o tecido neoformado;
- **Biodegradáveis e/ou bioreabsorvíveis** – os *scaffolds* devem possuir uma taxa de degradação e de reabsorção controláveis e compatíveis com o tecido ósseo;
- **Propriedades mecânicas adequadas** – deve haver compatibilidade entre as propriedades mecânicas do *scaffold* e as do tecido no local da implantação, para assim prevenir o *stress shielding* e reabsorção óssea;
- **Processamento simples** – o processamento deve ser simples e adaptável para diferentes formas e tamanhos [23,24].

2.1. Biomateriais utilizados em scaffolds para tecido ósseo

Para a concepção de um material macroporoso para aplicações biomédicas, tem de se ter em conta alguns critérios, como porosidade, composição adequada, elevada estabilidade mecânica combinada com a degradação controlada, boa biocompatibilidade, capacidade de suportar forças de carga, etc. No entanto, uma boa estratégia para alcançar as expectativas inerentes aos materiais macroporosos é a combinação de diferentes materiais que juntos ajudem a satisfazer todas as necessidades. Bons resultados têm sido obtidos através da combinação de materiais cerâmicos com polímeros devido à natureza e propriedades diferenciadas de cada um deles, que quando juntos se complementam ultrapassando algumas das suas deficiências.

Para a construção de *scaffolds*, utilizam-se atualmente biomateriais de natureza muito variada: polímeros de origem sintética ou natural, materiais cerâmicos e ainda materiais compósitos. Alguns vidros com cálcio e fósforo na sua composição apresentam elevada bioatividade, demonstrada pela formação de cristais de HAp na sua superfície depois do contacto com o plasma humano e por esta razão, são também bastante usados na engenharia do tecido ósseo [5,25].

Existem diversos artigos de revisão sobre os materiais usados na engenharia de tecidos [26–28], no entanto, apenas se irá dar ênfase às classes de materiais utilizados neste trabalho, nomeadamente os polímeros e os biocerâmicos. Além destas classes de materiais serão também abordados os nanotubos de carbono pois também foram utilizados na construção dos *scaffolds* em questão. Esta decisão passou pelo facto de nos tempos atuais ter surgido o interesse no desenvolvimento de estruturas que incorporem estas estruturas de carbono, pois estes possuem interessantes propriedades que podem promover a melhoria dos *scaffolds*, mais particularmente ao nível das propriedades mecânicas e elétricas.

2.1.1. Polímeros

A utilização de materiais poliméricos biodegradáveis na construção de *scaffolds* reside no facto de estes satisfazerem muitas das exigências técnicas e biológicas necessárias para tal aplicação [5].

Dos polímeros degradáveis usados na engenharia de tecidos, existem duas classes distintas: os naturais e os sintéticos.

Os polímeros naturais são obtidos de fontes naturais, de origem animal ou vegetal, tais como: o colagénio, a celulose, a fibrina, o quitosano, o ácido hialurónico, etc. As principais vantagens residem no facto de estes induzirem baixas reações imunológicas adversas, possuírem boa capacidade de interação com o tecido hospedeiro, aptidão para serem quimicamente modificados e de poderem ser encontrados na natureza. Como desvantagens, possuem reduzida resistência mecânica, e degradam rapidamente quando em contacto com o plasma [5].

Os polímeros sintéticos são atualmente os mais utilizados na conceção de *scaffolds*, destacando-se os polihidroxiácidos, os polipropileno fumaratos, os polifosfazenos, a policaprolactona, os policarbonatos e os polianidridos. Os polímeros sintéticos têm a vantagem de poderem ser facilmente moldados em formas específicas. Além disso, é possível controlar as suas propriedades mecânicas e a taxa de degradação em meio fisiológico [5].

A Tabela 2 apresenta alguns detalhes sobre a origem e as principais características de alguns dos polímeros previamente referidos.

Tabela 2 - Polímeros naturais e sintéticos usados em *scaffolds* de regeneração óssea. Adaptado de [5]

Material	Origem	Características
Colagénio	Natural	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa resposta imunológica • Bom substrato para adesão celular • Quimiotático • <i>Scaffolds</i> com baixas propriedades mecânicas
Quitosano	Natural	<ul style="list-style-type: none"> • Promove osteocondução, migração celular e vascularização • Hemostático
Amido	Natural	<ul style="list-style-type: none"> • Biocompatível e não-tóxico • Comportamento termoplástico • Bom substrato para adesão celular • <i>Scaffolds</i> com boas propriedades mecânicas
Ácido hialurónico	Natural	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa resposta imunológica • Quimiotático quando combinado com os agentes apropriados • <i>Scaffolds</i> com baixas propriedades mecânicas
Polihidroxiácidos	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> • Poliésteres alifáticos • Aprovados para uso clínico • Degradados por hidrólise • Podem originar problemas de biocompatibilidade e citotoxicidade no local do implante
Policaprolactona	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> • Poliéster alifático • Degradação lenta por hidrólise • Alguns problemas relacionados com o suporte de cargas mecânicas
Polipropileno fumaratos	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> • Poliésteres insaturados • Degradados em ácido fumárico e propileno glicol • Comportamento biológico satisfatório
Polifosfazenos	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> • Degradação por hidrólise
Polianidridos	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> • Normalmente utilizados em sistemas de entrega controlada de fármacos • Biocompatíveis • Suportam a regeneração do osso cortical e trabecular

Por ser o material utilizado no presente trabalho, abordar-se-á, seguidamente, os aspetos mais relevantes da PCL para esse tipo de aplicação.

2.1.1.1. Policaprolactona (PCL)

A PCL é um polímero que tem sido investigado, tanto no processamento como nas suas propriedades, pelo facto de ser biodegradável. A sua unidade de repetição está ilustrada na Fig. 8.

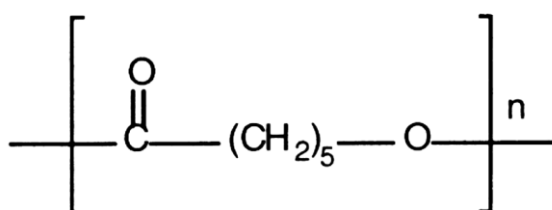


Fig. 8 - Unidade de repetição da PCL [20].

É um polímero semicristalino que possui uma temperatura de transição vítrea de -60 °C, um ponto de fusão de 60° C e uma temperatura de degradação de 350°C [29,30].

A PCL é um material aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) desde a década de 1970, é biocompatível e pode ser encontrada em componentes de sutura. Atualmente, a PCL tem sido cada vez mais utilizada no campo da engenharia de tecidos por algumas qualidades atrativas tais como: boa solubilidade em solventes orgânicos, capacidade de ser processada a baixas temperaturas e possuir derivados de degradação não tóxicos [31]. Como característica interessante, a PCL possui também uma taxa de biodegradação *in vivo* de longo termo (demora cerca de 24 meses até perder a sua massa total) fazendo com que seja, portanto, um material interessante para aplicações que requerem longos tempos de degradação.

Quanto às suas propriedades mecânicas, a PCL possui um módulo de elasticidade de 200-440 MPa, resistência à tração de 20-42 MPa e resistência à compressão de 120 MPa, sendo um material interessante para a construção de *scaffolds* para regeneração de tecido ósseo [29,32].

2.1.2. Biocerâmicos

Os materiais cerâmicos usados em aplicações biomédicas, também chamados de biocerâmicos, distinguem-se por serem biocompatíveis, apresentando, no entanto, ausência de ductilidade e uma baixa resistência à fratura [25].

Dos biocerâmicos mais utilizados destacam-se a Zircónia (ZrO_2), a alumina (Al_2O_3), e os fosfatos de cálcio. Tanto a alumina como a zircónia são consideradas cerâmicos bioinertes e não desenvolvem ligações químicas com o osso [25].

Os fosfatos de cálcio são cerâmicos bioativos e interagem com o tecido através de transformações superficiais causadas pelo organismo através de ligações bioquímicas, seguidas da substituição pelo osso neoformado. Os fosfatos de cálcio têm merecido particular interesse uma vez que, além de bioativos, possuem composição química semelhante à da fase mineral do tecido ósseo [25,33].

Nem todas as fases de fosfato de cálcio são estáveis no corpo humano, uma vez que a sua estabilidade depende essencialmente da temperatura e do pH do meio. A 37°C , temperatura do corpo humano, apenas dois fosfatos de cálcio são estáveis em contacto com os fluidos corporais. Para os fluidos humanos com valor de pH inferior a 4,2, a fase estável é o fosfato dicálcico, mais conhecida como brushite. Por outro lado, para os fluidos humanos com valor de pH superior ou igual a 4,2, a fase estável presente é a hidroxiapatite de fórmula geral $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A sua composição é variável, encontrando-se no osso, frequentemente, uma apatite carbonatada deficiente em cálcio [33,34].

2.1.2.1. Hidroxiapatite nanocristalina substituída com silício

A semelhança da HAp com a matriz inorgânica dos tecidos ósseos faz com que esta seja um dos materiais mais biocompatíveis e um dos fosfatos de cálcio mais investigados. A

HAp favorece o crescimento ósseo (osteocondução), é bioativa pois leva à formação de ligações de natureza química com o tecido ósseo, permite a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas. Apesar das inúmeras vantagens citadas, a HAp possui a desvantagem de ter propriedades mecânicas pobres relativamente ao tecido ósseo, havendo a necessidade de a combinar com outros materiais que lhe confirmem melhores propriedades mecânicas [20].

A HAp pode ser sintetizada na sua forma nanocristalina, para ser mais semelhante com a encontrada no osso natural (HAp de cristais nanométricos com tamanhos entre 20 e 50 nm ordenados numa estrutura hierárquica) [3].

Quando comparada com a HAp microcristalina sintética convencional, verifica-se que a HAp nanocristalina exibe uma grande eficácia biológica ao ser mais reativa, além disso, a hidroxiapatite nanocristalina é mais bioativa e apresenta propriedades mecânicas superiores, pois o menor tamanho de grão confere uma maior área superficial e melhora o empacotamento das partículas [35,36].

Recentemente tem-se demonstrado também que a HAp pode ser sensivelmente melhorada no ponto de vista da sua resposta biológica, pela incorporação de iões selecionados no interior da estrutura de apatite, nomeadamente os iões de silício (Si). O motivo para a utilização do Si vem desde 1970 quando Carlisle investigou o seu papel no osso, verificando a sua relevância nos processos metabólicos associados à formação óssea e calcificação. A HAp sintética que incorpora pequenas quantidades de Si tem mostrado performances biológicas melhoradas como bioatividade óssea, aumento do crescimento ósseo (osteocondução) e da degradação mediada por células [37,38].

2.1.3. Nanotubos de carbono (CNTs)

Os nanotubos de carbono (CNTs, do inglês *carbon nanotubes*) foram descobertos em 1991, por Iijima [39] e, desde então que se tornaram num objeto de grande investigação. Estes correspondem a uma das formas alotrópicas (elementos que existem em duas ou mais estruturas moleculares diferentes) do carbono, possuem ligações sp^2 ($\approx 1,4$ Å) e exibem uma nanoestrutura cilíndrica resultante do enrolamento de uma única folha de grafeno em torno de um eixo, possuindo nas suas extremidades um hemifulereno [39].

Os CNTs podem ser classificados em CNTs de parede única (Single Wall CNT – SWCNT), ou seja, um cilindro com somente uma parede externa, com diâmetro entre 1 – 2 nm; e em CNTs de parede múltipla (Multy Wall CNT- MWCNT), compostos por múltiplos cilindros coaxiais de SWCNT, que podem medir entre 2 – 100 nm e possuir uma distância entre paredes de aproximadamente 0,34 nm (Fig. 9) [14].

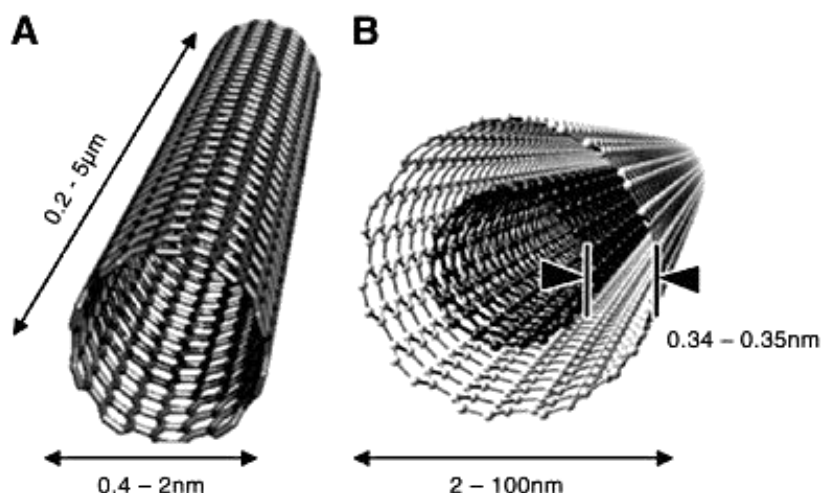


Fig. 9 - Figura Diagrama de SWCNT (A) e de MWCNT (B) mostrando as dimensões típicas de comprimento, largura e distância entre paredes dos MWCNT.[40]

Devido às suas notáveis características mecânicas (elevada dureza e resistência), elétricas (alta condutividade), químicas (estabilidade e fácil funcionalização) e estruturais (baixo peso, elevada razão de aspeito e área superficial específica), os CNTs cada vez mais atraem o interesse científico e tecnológico, em virtude das suas significativas vantagens sobre a maioria dos materiais existentes, fazendo deles, um material de grande interesse em diversas aplicações, incluindo as aplicações biomédicas [41].

Sendo o carbono o principal componente das biomoléculas, faz sentido que atualmente os investigadores se centrem nos CNTs e procurem estudar cada vez mais a sua biocompatibilidade e bioatividade, havendo já estudos que relatam o aumento da atividade de células vivas adjacentes a estes [42,43]. Devido ao seu elevado módulo de Young, acredita-se que os CNTs sejam o reforço ideal para compósitos, nomeadamente para a construção de *scaffolds*. Podem também agir como um biossensor e como fase eletrocondutora, aportando a possibilidade de os estimular (mediante um estímulo elétrico

externo) com a intenção de influenciar o crescimento e proliferação de células ósseas, levando possivelmente ao incremento da formação de tecido ósseo [41,44,45].

Tabela 3 - valores das propriedades mais relevantes dos MWCNTs.

Propriedade	Valor	Ref.
Densidade	2,6 g/cm ³	[46]
Módulo de Young	1,2 TPa	[14]
Condutividade elétrica	1,85x10 ³ S/cm	[47]

2.1.3.1. Biocompatibilidade e toxicidade dos CNTs

Como referido anteriormente, os CNTs possuem inúmeras propriedades interessantes para aplicações biomédicas, no entanto, para a sua aplicação nessa área é necessário que seja avaliada a sua biocompatibilidade e toxicidade [48,49].

Sabe-se que parâmetros como a estrutura, distribuição de tamanho, química de superfície, carga superficial, e estado de aglomeração, bem como a pureza das amostras, pode ter um impacto considerável sobre a reatividade dos nanotubos de carbono. Como por exemplo, um CNT com dimensões de 20x2000 nm, pode ter uma área superficial 100 vezes maior do que uma nanopartícula esférica com diâmetro de 20 nm o que representa um fator significativo na sua toxicidade. Por outro lado, a sua propensão a formar aglomerados leva a uma consequente diminuição da área superficial disponível para interagir com as células envolventes [50,51].

Atualmente, existem já diversos estudos sobre inalação e injeção na corrente de CNTs, indicando a sua toxicidade. No entanto, considera-se que após a sua funcionalização (modificação química da sua superfície) através da introdução de grupos polares na sua superfície, pode resultar numa diminuição da sua toxicidade [49,52,53].

Estudos efetuados em ratos, nomeadamente os estudos de Lam et al. revelaram que após a introdução endotraqueal de CNTs houve alteração na aparência do pulmão ao nível macroscópico e ao nível microscópico, observou-se o desencadeamento de respostas inflamatórias e a formação de granulomas e formação de granulomas em redor

dos CNTs (Fig. 10) (formações redondas constituídas por células imunitárias, nomeadamente macrófagos). Estas estruturas indicam a presença de tecido lesado, sendo o indicador de várias doenças como tuberculose e histoplasmose. De facto, estes resultados já eram antevistos, devido às características intrínsecas de não degradabilidade dos CNTs assim como da sua forma em agulha, semelhante à dos asbestos, cuja toxicidade por inalação é já conhecida. Por este aspeto, a pesquisa da toxicidade dos CNTs tem sido focada no pulmão, havendo mesmo a sensibilização para a tomada de medidas rigorosas de higiene e proteção durante o seu manuseamento [54,55].

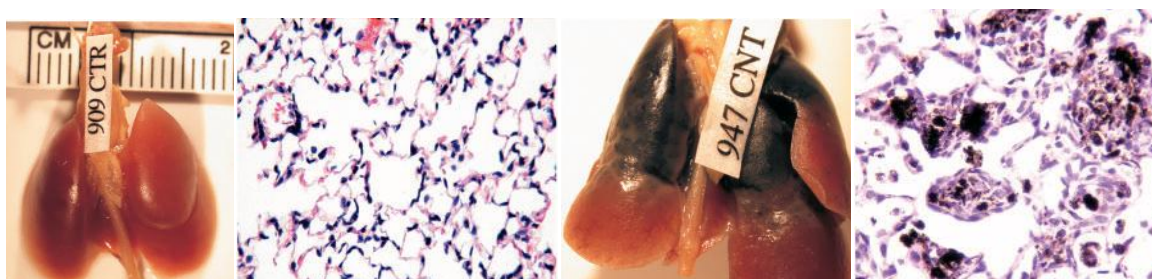


Fig. 10 - Imagens de fotografias de pulmões de ratos e de microscopia do tecido pulmonar. As imagens (A) e (B) correspondem aos ratos de controlo sem exposição aos CNTs e as imagens (C) e (D) após a exposição aos CNTs. Verifica-se que na imagem (C) os pulmões apresentam uma modificação da sua aparência quando comparados com a imagem (A). Na imagem (D) verifica-se a existência de granulomas a envolverem os CNTs (partículas pretas). Imagens adaptadas de [54].

Em estudos que analisaram a citotoxicidade proveniente dos nanotubos de carbono, mostram claramente que, sob certas condições, os CNTs podem atravessar barreiras de membrana celular, alojando-se dentro das células, migrando também para os seus núcleos, apontando que estes, ao alcançar os órgãos, podem provocar efeitos nocivos tais como reações inflamatórias [49,51,52].

Relativamente a estudos sobre a toxicidade após a ingestão de CNTs, verificou-se em ratos, que os mesmos se alojam na maioria dos órgãos do corpo com a exceção do cérebro [51].

Apesar da evidência da toxicidade dos CNT, existem também uma série de estudos publicados sobre biomateriais à base de CNTs, que suportam a sua biocompatibilidade, assim como, a de materiais que os incorporam na sua estrutura. [14,44,45,56–58]. No

entanto é de salientar que biocompatibilidade é variável dependendo da taxa de degradação dos materiais, da concentração de CNTs utilizadas, assim como das aplicações em que os CNTs vão ser utilizados, nomeando neste caso a sua utilização em:

- Meios diagnósticos,
- Construção de biossensores,
- Tratamentos farmacológicos,
- Substratos para o crescimento celular para intervenções de medicina regenerativa,
- Substratos para detecção de anticorpos associados a doenças do sistema autoimune com alta especificidade,
- Substratos para o sequenciamento de genes,
- Construção de scaffolds, entre outros [44,45,59–63].

Assim, para melhor compreender a influência dos CNTs nas células e comprovar a sua biocompatibilidade tem-se desenvolvido estudos baseados na investigação das interações entre materiais à base de CNTs e células neuronais, fibroblastos, osteoblastos, anticorpos, canais iônicos e membranas celulares. De acordo com os dados obtidos nos estudos com as células mencionadas, registou-se que os CNTs são capazes de promover a proliferação e adesão de células, sem efeitos citotóxicos [49].

Falando em casos específicos, observou-se em culturas de células neuronais no estudo de Webster et al. que ao final de quatro dias de cultura, num compósito de poliuretano com CNTs que possuía um padrão específico fabricado através de litografia, houve proliferação e formação de conexões intercelulares e a formação de axónios que replicavam o padrão presente no material [64].

No caso dos estudos efetuados com células osteoblásticas, existem também diversas publicações que apoiam que os CNTs são biocompatíveis, estimulando também o crescimento e a adesão deste tipo celular à sua superfície [42,45].

2.1.4. Scaffolds compósitos

Devido à existência de limitações próprias de cada biomaterial utilizado, têm vindo a ser investigadas novas estratégias de combinação de materiais com diferentes características na construção de *scaffolds* de materiais compósitos.

Um material compósito é na sua definição tradicional um material constituído por pelo menos duas fases, uma fase contínua e uma dispersa. A fase contínua é responsável pelo preenchimento em volume e transferência de tensões para a fase dispersa, enquanto que a fase dispersa é normalmente responsável pelo aumento de uma ou mais propriedades do compósito. Algumas das propriedades de interesse que podem ser melhoradas no desenvolvimento de materiais compósitos são, por exemplo, as propriedades mecânicas e as propriedades elétricas [65].

No caso dos *scaffolds*, a combinação de materiais tem como objetivo melhorar as propriedades mecânicas, elétricas, taxas de degradação, índices de biocompatibilidade e biodegradabilidade.

Falando em exemplos de materiais utilizados, várias combinações têm sido utilizadas, tais como:

- Polímeros com biocerâmicos [66–69];
- Polímeros com CNTs [70–73];
- Biocerâmicos com CNTs [14,74–83].

A combinação de polímeros com fosfatos de cálcio, particularmente a HAp, resulta num compósito com boas propriedades mecânicas e boa biocompatibilidade, fazendo com que as vantagens dos dois tipos de materiais minimizem, no final, as suas deficiências.

Mecanicamente, os polímeros desempenham um papel crucial ao estabelecerem uma ligação física com a hidroxiapatite, pois ao serem dúcteis, conferem uma melhor estabilidade mecânica ao material cerâmico que é muito frágil e propenso a fraturas catastróficas.

No caso dos compósitos que incorporam CNTs, no que toca aos compostos poliméricos e biocerâmicos, estes vão conferir boas propriedades mecânicas aos corpos produzidos, mas também vão torná-los em materiais condutores elétricos. Neste último caso, os *scaffolds* podem funcionar como materiais inteligentes que estimulam a proliferação celular através da aplicação de estímulos elétricos no local [39,40].

2.2. Técnicas de fabrico de scaffolds - tradicionais vs avançadas

Com o intuito de satisfazer os requisitos necessários, os *scaffolds* devem ser concebidos com biomateriais que possuam as propriedades adequadas aos tecidos que se pretendem reparar. No entanto, os requisitos básicos associados às exigências geométricas tornam a produção do scaffold um processo difícil. Assim, a seleção do método de fabrico torna-se essencial pois a arquitetura do scaffold deverá ter como base as características do tecido a regenerar, a complexidade do desenho pretendido, assim como o material a utilizar.

O fabrico dos *scaffolds* pode-se dividir em dois métodos: **convencional e avançado**.

Os **métodos convencionais** que incluem técnicas como, formação de espumas, liofilização, lixiviação, separação de fase e enformação de fibras há muito que são mal sucedidos pois não permitem o controlo da arquitetura interna e possuem fraco controlo sobre a porosidade. Estas duas limitações não são de todo convenientes, uma vez que em estudos já efetuados foi comprovado que a porosidade e interconectividade dos poros é uma variável fulcral na vascularização, proliferação celular e mineralização do tecido ósseo nos *scaffolds* [20,41]. Além disso, os métodos convencionais possuem ainda as seguintes limitações:

- **Operação manual** – a maior parte dos procedimentos de fabrico são de difícil industrialização pois exigem muita mão-de-obra, são dependentes do operador e exigem muito tempo, o que torna difícil a sua produção em massa. Além disso torna os processos de fabrico pouco reprodutíveis.
- **Fracas propriedades mecânicas** – os materiais fabricados por estas técnicas possuem normalmente propriedades mecânicas baixas, o que torna difícil a sua aplicação em regiões do corpo sujeitas a cargas elevadas.

- **Uso de solventes orgânicos tóxicos** – a utilização de solventes orgânicos tóxicos pode afetar a biocompatibilidade do scaffold [24].

Para ultrapassar as limitações inerentes aos métodos convencionais no fabrico de *scaffolds*, tais como a incapacidade de controlar a o tamanho do corpo e do poro, geometria e distribuição espacial, foram desenvolvidas as técnicas de processamento por **métodos avançados** ou de prototipagem rápida (PR).

Podemos considerar que o processo de PR, para construção de *scaffolds* para engenharia de tecidos, assenta nas seguintes etapas básicas (Fig. 11):

- Aquisição de imagens tridimensionais da área a tratar através de técnicas de imagem diagnóstica, nomeadamente tomografia axial computadorizada (TAC).
- Conversão das imagens adquiridas, através de um *software* CAD (*computer aided design*), nos modelos virtuais da estrutura a ser produzida.
- Transformação do modelo virtual num conjunto de camadas sucessivas pelo *software* CAM (*computer assisted manufacturing*);
- Construção do objeto, através da adição sucessiva de camadas de material, dando origem a um *scaffold* com propriedades individuais que será posteriormente cultivado com células [85].

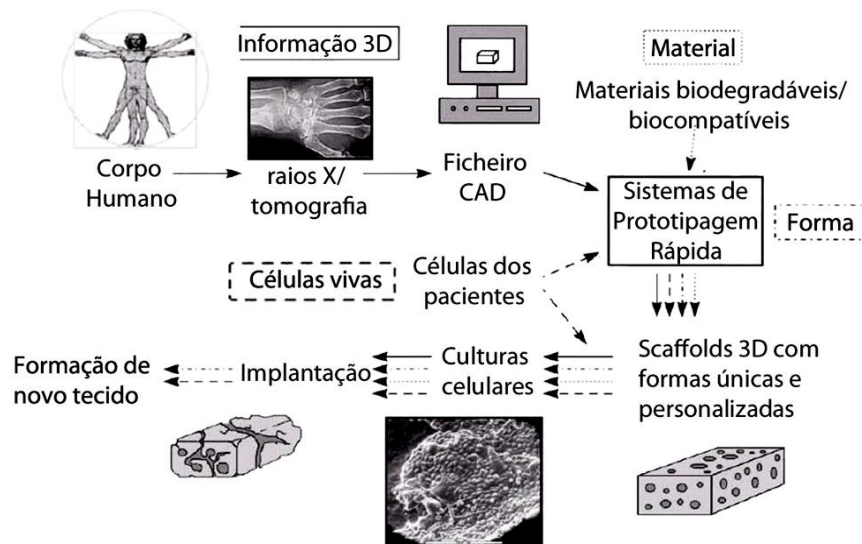


Fig. 11 - Imagem ilustrativa do método de PR para aplicações biomédicas. Adaptado de [85].

Atualmente têm sido exploradas e adaptadas à construção de *scaffolds* as técnicas de:

- **Modelagem por deposição de material fundido (Fig. 12)** - consiste na adição de um material fundido por camadas estando este armazenado no interior de um rolo de abastecimento. O material desloca-se até à cabeça de extrusão aquecido para derreter o material, sendo de seguida extrudido segundo o modelo CAD. No final da construção de uma camada, a mesa de construção desce e seguindo-se a construção da nova camada [24,86,87].

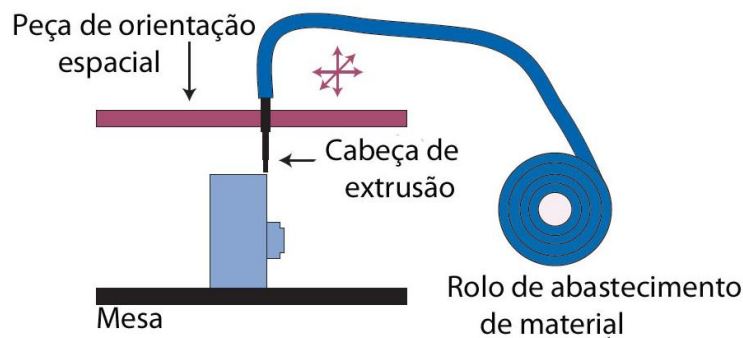


Fig. 12 - Dispositivo de impressão de modelagem por deposição de material fundido. Adaptado de [86]

- **Impressão 3D (Fig. 13)** – O processo tem início na deposição de uma camada uniforme de pó de material no topo da cuba de fabrico. O pó transportado é transportado da cuba de alimentação para a cuba de fabrico através de um rolo de nivelamento, que procede à distribuição e compactação do pó na cuba de fabrico. Seguidamente a cabeça de impressão deposita o ligante sobre o pó, provocando a ligação das partículas do pó entre si na zona de impressão pretendida. Este processo repete-se sucessivamente, camada a camada, até a peça estar completa [24,86,87].

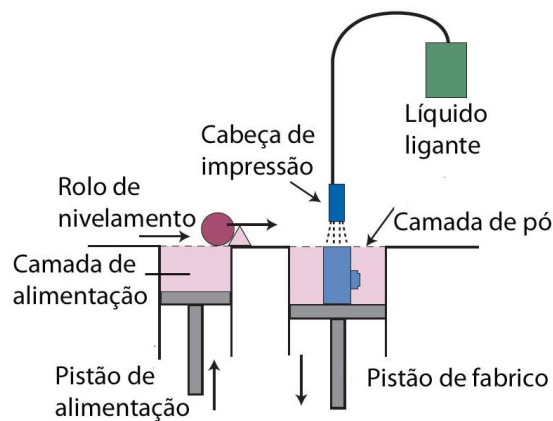


Fig. 13 - Esquema de um equipamento de impressão 3D. Adaptado de [86]

- **Sinterização seletiva a laser (Fig. 14)** - é uma técnica de fabrico que utiliza um feixe laser de CO_2 para fundir o pó ou partículas de plástico, metal ou de cerâmica de forma a formar o objeto desejado. A construção inicia-se com a colocação de uma camada de pó através de um rolo de nivelamento. O sistema laser varre seletivamente a zona de construção de forma a recriar a informação proveniente do ficheiro CAD. Depois de concluída a camada, a plataforma de construção desce repetindo se o processo [24,86,87].

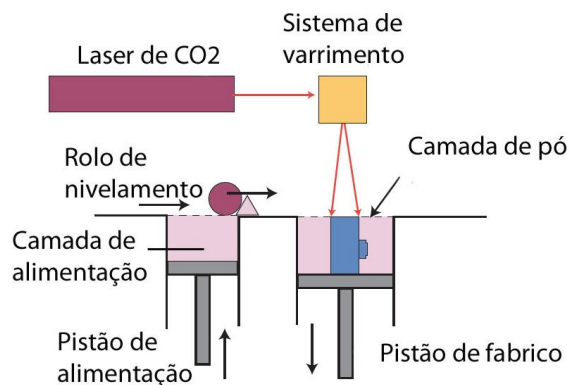


Fig. 14 - Representação esquemática de um equipamento de sinterização seletiva a laser. Adaptado de [86]

- **Estereolitografia (Fig. 15)** - a técnica de estereolitografia consiste no fabrico de corpos através da solidificação de uma resina fotossensível, camada a camada, utilizando para o efeito uma cuba com um polímero de cura fotossensível, uma

placa de elevação e um feixe laser UV. Cada vez que o laser passa, a resina exposta solidifica e liga-se à camada inferior [24,86,87].

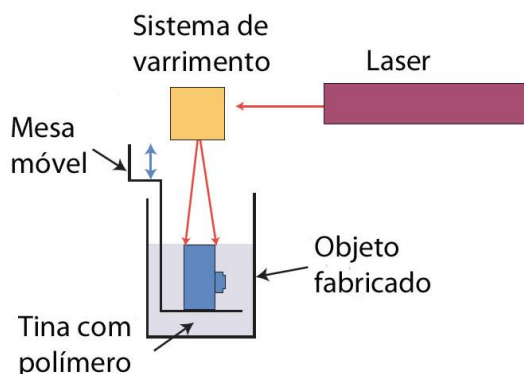


Fig. 15 - Esquema representativo de um equipamento de estereolitografia. Adaptado de [86].

- **Impressão direta por extrusão (Fig. 16)** - No caso específico do processo de impressão direta por extrusão, esta foi a técnica de processamento utilizada no presente trabalho. O processamento inicia-se com a produção da suspensão que vai ser utilizada, verificando se esta possui propriedades adequadas para ser extrudida através da agulha que desenha o material. De seguida o material é colocado dentro de uma seringa e posteriormente extrudido através da agulha, camada a camada, em cima de uma plataforma, seguindo o padrão existente no ficheiro CAD, como ilustrado na figura. Quando uma camada está completa, o sistema passa para a camada seguinte. [85].

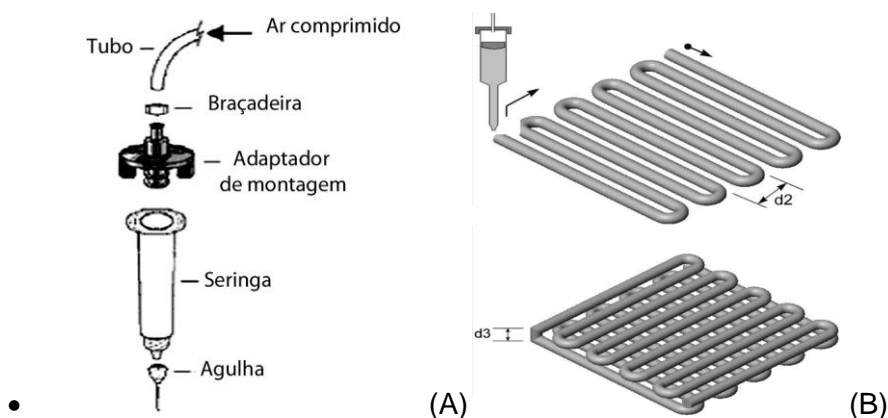


Fig. 16 – Ilustração esquemática de um conjunto de distribuição pneumática (A) e esquema da dispensa da pasta camada a camada (B). Adaptado de [85,88].

A técnicas de PR mencionadas muito promissoras devido à sua versatilidade e rapidez de processamento, permitindo a construção de objetos com formas e desenhos complexos quase ilimitados, com o controlo da arquitetura interna e porosidade, tendo também a vantagem da utilização de uma grande variedade de materiais [87].

3. *Electroestimulação das células ósseas*

Há muito tempo que se reconhece que a ação de estímulos físicos, tais como a carga mecânica e a estimulação elétrica, ajudam na cura de fraturas ósseas através da promoção da osteogênese.

Desde o início do século XX, que se realizaram várias experiências que utilizavam a corrente elétrica como estímulo para a consolidação de fraturas ósseas, baseando-se nas propriedades elétricas dos ossos. No entanto, foram os estudos de Fukada e Yasuda que levaram ao aumento do interesse para procurar explicações para o efeito da corrente elétrica na reparação óssea. A conclusão que eles retiraram dos seus estudos foi que a deformação do tecido ósseo produz potenciais elétricos que estimulam a formação óssea. Como consequência, subentendeu-se que a estimulação elétrica, aplicada de forma exógena, poderia agir como estímulo para o osso. Desde então a estimulação elétrica tem sido utilizada na medicina para indução dos processos de recuperação de fraturas ósseas sem a necessidade de realizar cirurgias [89–91].

Existem vários processos que mostraram ser eficazes na estimulação elétrica sobre uma fratura, cada um com benefícios e desvantagens. Estes métodos podem ser não invasivos que funcionam através da colocação de elétrodos sobre a pele e invasivos, pela sua colocação no interior do corpo no local da fratura que são posteriormente ligados a um gerador de corrente. A corrente usada em ambos os métodos pode ser contínua, corrente alternada ou corrente pulsada (Fig.17) [92].

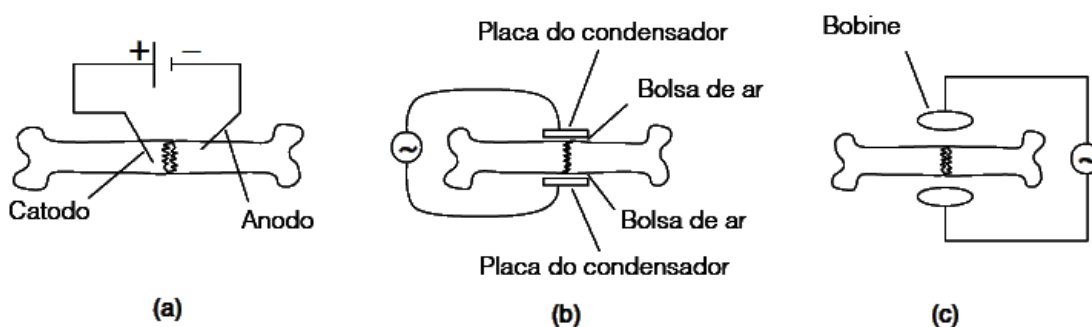


Fig. 17 - Esquema ilustrativo dos diferentes métodos de estimulação elétrica que utilizam diferentes fontes de corrente **(a)** corrente contínua, **(b)** corrente alternada **(c)** corrente pulsada. Adaptado de [92].

É de interesse referir que, qualquer que seja o método para a estimulação elétrica, a quantidade de corrente a ser gerada no sítio da fratura deve situar-se numa gama entre 5 e 100 μA [91]. Esta gama justifica-se fazendo algumas deduções simples com o recurso à lei de Joule relacionada com a sobrevivência celular. Segundo a lei de Joule, quando um material condutor é percorrido por uma determinada corrente elétrica ocorrem interações entre os eletrões e os átomos do material que resultam num aumento da sua energia cinética, levando conseqüentemente ao seu aquecimento. Ou seja, quando ocorre o efeito de Joule, há a transformação de energia elétrica em energia térmica. Ora sabendo da ocorrência do efeito de Joule e da morte celular a partir dos 42°C, tornou-se conveniente estabelecer uma gama de correntes aplicadas que não levem ao aquecimento dos materiais até estas temperaturas, impedindo assim a morte celular.

O uso terapêutico dessas técnicas, por exemplo para o tratamento de fraturas, osteoporose e melhoria de implantes ósseos, tem originado bons resultados clínicos embora essas práticas ainda sejam aplicadas de forma empírica [89,90].

Para melhor compreender este fenómeno, têm sido conduzidos estudos *in vitro* para demonstrar a utilidade da estimulação elétrica na regeneração óssea ao nível celular. Estes consistem na exposição de osteoblastos a correntes elétricas através da imersão de elétrodos no meio de cultura celular (Fig. 18). Estes elétrodos são seguidamente ligados a um gerador de corrente elétrica [45,93–95].

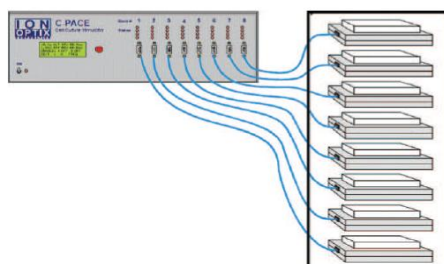


Fig. 18 - Ilustração esquemática de um sistema de estimulação elétrica, mostrando as placas de cultura, o conjunto de elétrodos colocados dentro da incubadora e o gerador de corrente [93].

Acredita-se que a estimulação elétrica leva à criação de produtos finais no cátodo referidos como produtos faradaicos, sendo a reação traduzida pela seguinte equação:



A produção de iões hidroxilo (OH) e diminuição do oxigénio faz com que haja um aumento do pH, formando um ambiente que inibe a reabsorção óssea e estimula a formação óssea pelo aumento da atividade dos osteoblastos e diminuição da atividade dos osteoclastos. Como produto secundário da reação aparece também o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), que tem efeito na diferenciação dos osteoblastos e na estimulação do fator de crescimento endotelial vascular, responsável pela angiogénese no local da fratura [91].

Pressupõe-se também, pelos estudos efetuados por Gan et al. que a eletroestimulação pode levar a um aumento da síntese, pelos osteoblastos, do fator de crescimento, particularmente, a proteína morfogenética óssea (BMP) [96].

Por último, sabe-se também que a estimulação elétrica leva à formação de osso através da ativação dos canais de cálcio presentes na membrana dos osteoblastos. Este mecanismo foi provado pois quando se submeteu os osteoblastos que tinham os seus canais de cálcio inibidos à corrente elétrica a sua proliferação diminuiu [91].

Os mecanismos explicados estão ilustrados na Fig. 19.

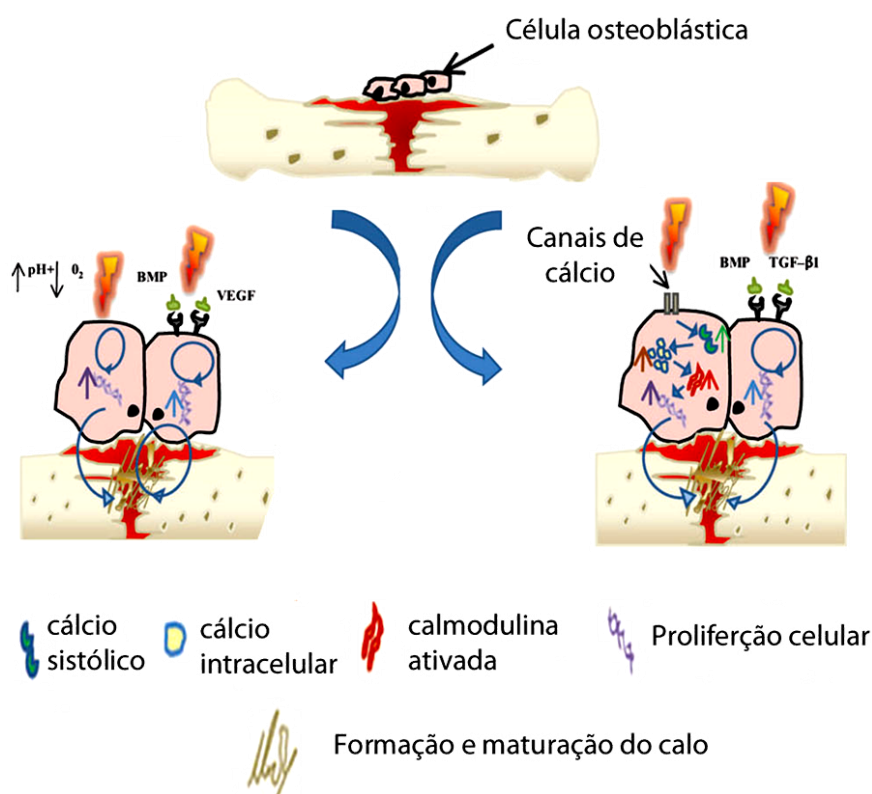


Fig. 19 - Esquema resumo para os mecanismos de ação da corrente elétrica propostos. Adaptado de [91].

No âmbito da estimulação óssea, combinada com a engenharia de tecidos e implantação de *scaffolds*, existem estudos sobre novas abordagens que utilizam *scaffolds* compósitos para regeneração óssea fabricados por novos materiais, transformando-os em estruturas eletrocondutoras. Estas estruturas vão permitir a cultura de células no seu interior que serão eletricamente estimuladas. Segundo o estudo de Supronowicz et al., a proliferação celular dos osteoblastos em *scaffolds* eletrocondutores (PLA (polylactic acid) + CNT's) é aumentada em 46%, o que vem provar, mais uma vez, que a estimulação elétrica é benéfica na osteogénese. [44]

Muito recentemente, M. Vila et al, desenvolveram materiais condutores através da incorporação de CNTs com sílica em estruturas mesoporosas ordenadas que se revelaram promissores para a estimulação elétrica de células ósseas, combinada com a ação de entrega controlada de fármacos no local. Este estudo provou que os materiais produzidos possuem grande potencial para a regeneração de fraturas ósseas, através da aplicação de estímulos elétricos externos, podendo ainda a regeneração ser potenciada através da entrega de fármacos adequados no local [45].

Capítulo II

Procedimento e técnicas experimentais

Procedimento e técnicas experimentais

Nesta secção serão descritos os materiais utilizados bem como as metodologias e técnicas experimentais utilizadas na preparação e caracterização das amostras.

De forma a possibilitar ao leitor uma compreensão mais completa relativamente às técnicas experimentais utilizadas ao longo do trabalho, estas possuem uma breve introdução teórica dos princípios de operação e, conjuntamente, as condições detalhadas de ensaio.

É de salientar que todo o processo de construção dos *scaffolds* foi efetuado no departamento de Química Inorgânica e Bioinorgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid (UCM).

A caracterização foi efetuada na universidade de Aveiro em diferentes departamentos. No Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica foram efetuadas as análises de DRX, ensaios de bioatividade, ensaios mecânicos de compressão, estudos de caracterização elétrica, análise por SEM e EDS. As análises de FTIR, Raman e ICP foram efetuadas no Departamento de Química, Física e Laboratório Central de Análises, respetivamente.

Foram também efetuadas análises na instituição de fabrico dos *scaffolds* (UCM), nomeadamente a caracterização por análise termogravimétrica e térmica diferencial, microscopia eletrónica de transmissão TEM, porosimetria de mercúrio e de azoto (N₂).

Por fim, os estudos de biocompatibilidade foram realizados na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

1. Matérias-primas

Para a produção da pasta inicial para a impressão 3D foram utilizadas as seguintes matérias-primas:

Tabela 4 – Matérias-primas utilizadas.

Matéria-prima	Forma de apresentação	Marca comercial
Policaprolactona	Pellets	Sigma-Aldrich
Si-Hidroxiapatite	Grânulos	N.A. (produzida em laboratório por precipitação)
MWCNTs	Pó	Nanocyl (purificados e funcionalizados em laboratório com o grupo -COOH)
Diclorometano	Líquido	Sigma-Aldrich

O diclorometano foi utilizado como dissolvente da PCL e também como meio dispersor da HAp, tendo um papel fundamental na homogeneização da pasta para a impressão.

2. Preparação dos scaffolds

Todo o processo experimental de preparação das amostras foi feito seguindo o protocolo investigado, desenvolvido e otimizado no departamento de Química Inorgânica e Bioinorgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid.

2.1. Preparação da pasta

Para o processamento da pasta foram preparadas misturas com cinco composições diferentes, com variação na percentagem de peso de MWCNTs (ver Tabela 5).

As seguintes percentagens de MWCNTs foram calculadas em relação à HAp:

Tabela 5 – Tabela descritiva das composições preparadas.

Compostos (%p/p) Composição	Policaprolactona (PCL)	Hidroxiapatite (HAp)	MWCNTs (CNTs)
0% CNTs	50%	50%	0%
0,75% CNTs	50%	49,25%	0,75%
2% CNTs	50%	48%	2%
4,5% CNTs	50%	45,5%	4,5%
10% CNTs	50%	40%	10%

Foram preparadas amostras sem nanotubos na sua composição (0% CNTs). Estas amostras serviram como meio de comparação (amostras de controlo) para as amostras com CNTs ao nível de propriedades elétricas, mecânicas, bioatividade, etc.

O procedimento experimental utilizado na produção das pastas está ilustrado esquematicamente na Fig. 20:

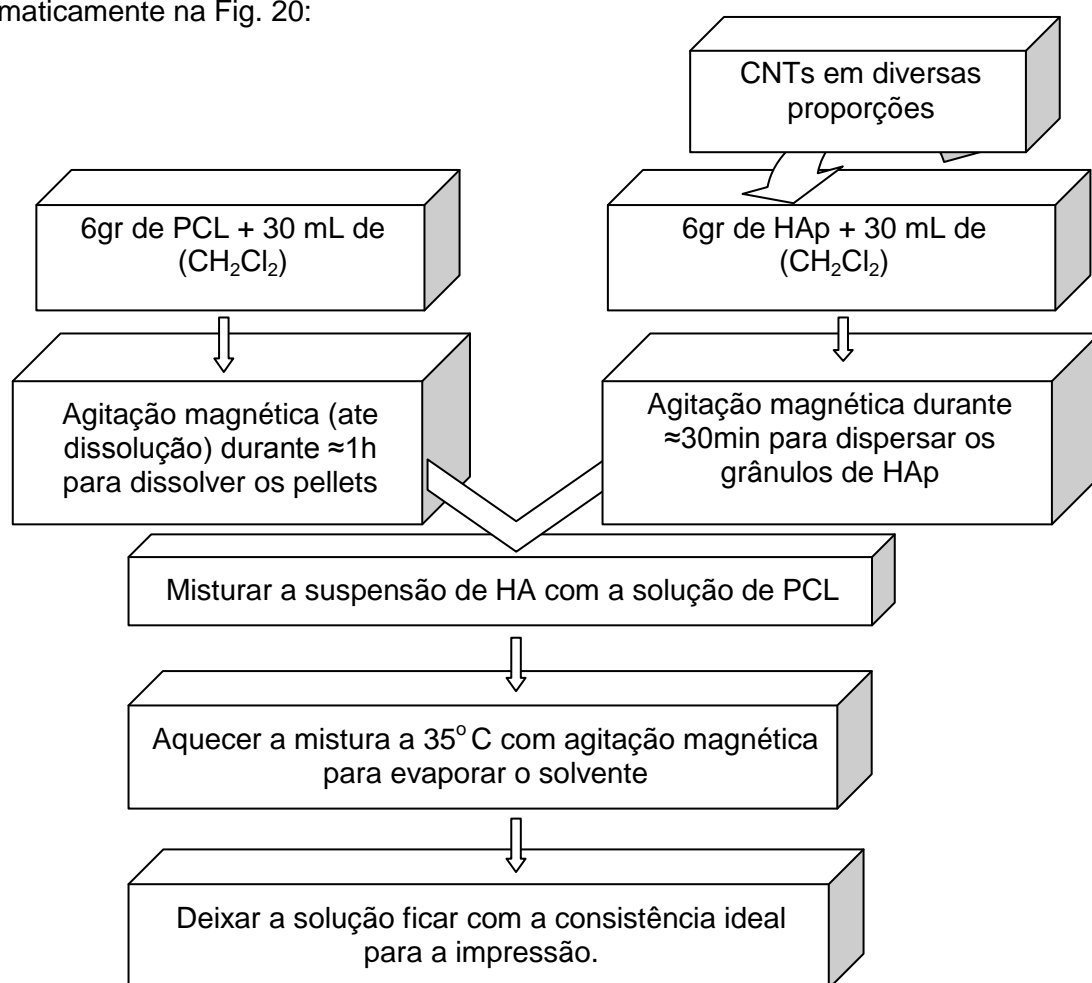


Fig. 20 – Diagrama do procedimento experimental realizado.

Nota: Para as amostras com incorporação de CNTs, estes foram adicionados na suspensão de HAp. Após mistura o tempo de dispersão utilizado foi aproximadamente 1h.

2.2. Impressão dos scaffolds

Os *scaffolds* foram construídos através do sistema de prototipagem rápida pelo método de impressão por deposição direta, utilizando um dispositivo *GmbH EnvisionTEC 3-D Bioplotter™* (Fig. 21 A).

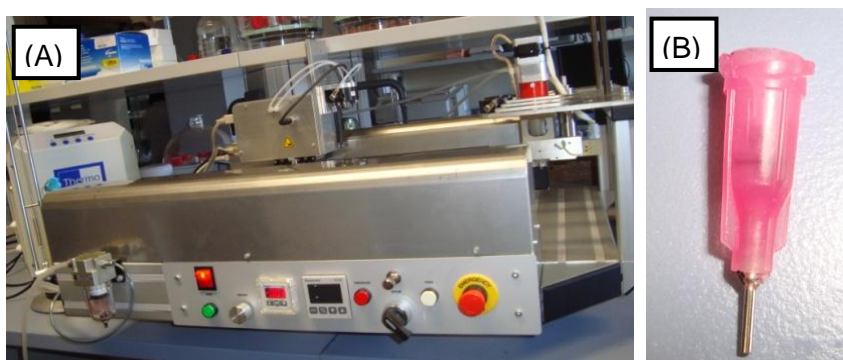


Fig. 21 - Equipamento de prototipagem rápida e bisel de impressão utilizado.

Inicialmente as pastas para impressão foram colocadas numa seringa que foram posteriormente imprimidas através de agulhas de 0,45 mm (Fig. 21 B). As pastas possuíam as seguintes propriedades reológicas: viscosidade entre 1 e 10 Pa/s e tensão de corte de 200 s^{-1} . Com estas propriedades, os *scaffolds* depois de impressos, possuíam a consistência ideal para passarem rapidamente ao estado sólido sem deformações significativas.

É de referir que todo o processamento foi efetuado à temperatura ambiente, assim como a secagem dos *scaffolds*.

Após este processo, o resultado final foram estruturas cilíndricas, de diâmetro aproximado de 6mm e macroporosas com uma rede de poros interconectados. Para melhor compreender esta estrutura foi realizada uma simulação em 3D (Fig. 22 A a D)

pela aluna e foram adquiridas imagens de microscopia ótica com ampliação de 10x (Fig. E e F).

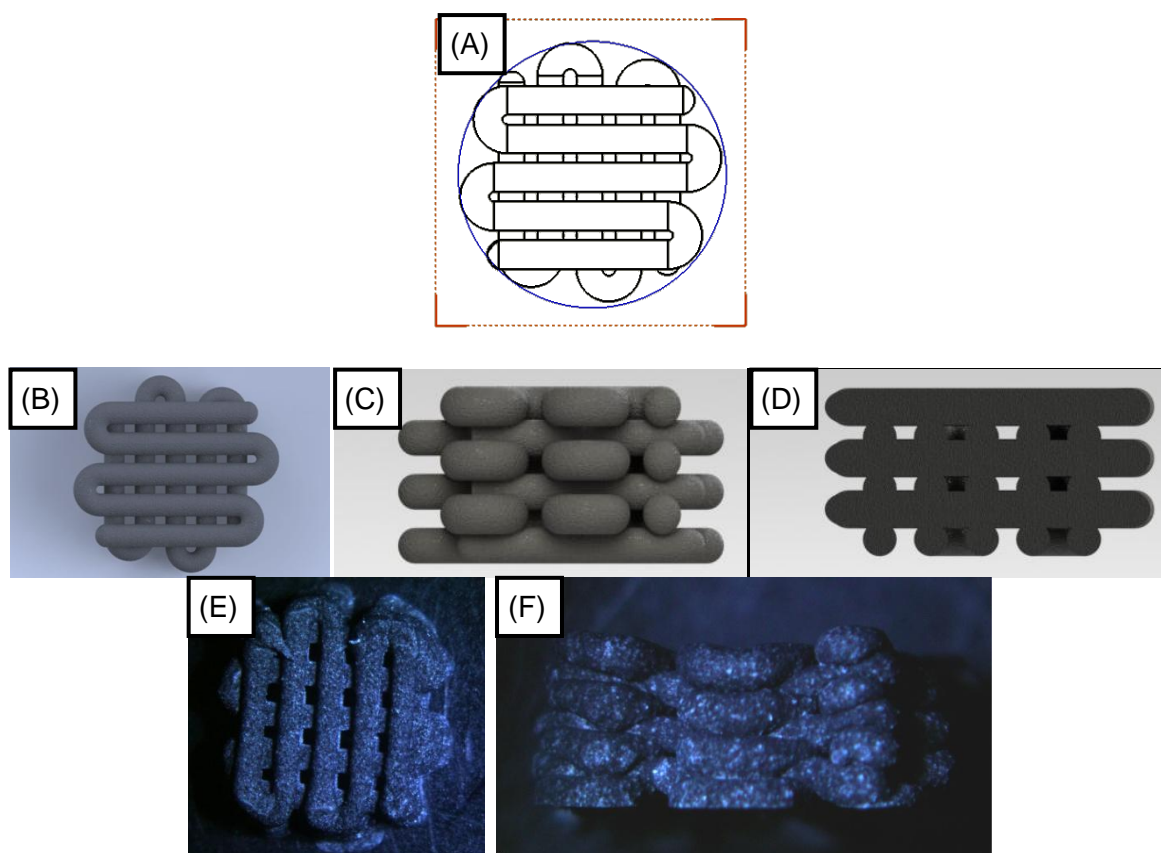


Fig. 22 – Imagens dos *scaffolds* obtidos. Desenho técnico dos *scaffolds* (A), simulação 3D no software *Solidworks* (B) a (D) e imagens reais das amostras com 2%CNTs na sua composição (E) e (F).

3. Técnicas de caracterização utilizadas

3.1. Difração de raios X

A difração de raios X (DRX) é uma técnica usada para caracterizar e/ou indentificar fases cristalina dos materiais. Cada material cristalino possui um difractograma (número de picos, intensidade e posição) que lhe conferem uma identidade única [97].

A difração de raios X foi utilizada neste trabalho, para identificação das respectivas fases cristalinas nos materiais utilizados e nos compósitos.

O equipamento utilizado foi um difractómetro *Rigaku Geigerflex D/Max-C series*, que origina raios X numa ampola com filamento de cobre com a aplicação de uma tensão de 40 kV e uma corrente de 30 mA. A radiação utilizada foi CuK_α e o varrimento efetuado foi contínuo entre os 10 e 80° (2 θ) com uma velocidade de 2°/min. A identificação das fases cristalinas foi possível através da comparação com os padrões publicados, quer em publicações científicas quer pela base de dados do *Joint Committee on Powder Diffraction – International Center for Diffraction Data* (JCPDS-ICDD).

3.2. Análises térmicas diferencia e termogravimétrica (DTA/TG)

As análises térmicas compreendem um grupo de técnicas que têm como objetivo medir propriedades físicas de um material, dependentes da temperatura, quando este é submetido a um programa de aquecimento controlado.

Na análise térmica diferencial (DTA do inglês *differential thermal analysis*), é medida a diferença de temperatura que se desenvolve entre uma amostra e um material inerte de referência, quando ambos são submetidos a idênticos tratamentos térmicos. Já na termogravimetria (TG) faz-se a análise da perda de massa de um material em função da temperatura [98].

Neste estudo, estas análises foram efetuadas para indetificar a percentagem de peso de cada constituinte existente e desta forma confirmar se correspondiam às composições inicialmente preparadas.

Ambas as análises (TG e DTA) foram realizadas numa atmosfera de ar, numa escala de temperatura entre os 30 e 1000° C, com uma taxa de fluxo de 100 mL / min e uma velocidade de aquecimento de 5 ° C/min, utilizando um equipamento *Perkin Elmer Pyris* com uma termobalança de diamante e um analisador térmico *2400 Perkin Elmer CHN*.

3.3. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)/ espectrometria de energia dispersiva (EDS)

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) é uma técnica de imagem utilizada no estudo da morfologia e topografia da superfície dos materiais, numa escala que pode ir até aos 10 nm. A superfície é varrida por um feixe eletrónico com elevada energia cinética, produzindo eletrões secundários. A deteção destes sinais permite obter imagens com a informação da topografia. Com o acoplamento dos detetores adequados, pode complementar-se a análise com a técnica de espectrometria de energia dispersiva (*Energy-dispersive spectroscopy*-EDS) e obter também informação sobre a composição elementar dos materiais estudados.

Em materiais não condutores é necessário recorrer à deposição (por evaporação) de uma fina camada de um material condutor (carbono ou ouro/paládio) antes da análise, senão a imagem obtida terá baixa definição devido a fenómenos de acumulação de carga [97].

As superfícies do topo das amostras e as superfícies de fratura foram analisadas com os equipamentos *Hitachi S4100* e *Hitachi SU-70* associado a um equipamento *Bruker QUANTAX 400* que permite efetuar a análise química dos elementos presentes na amostra através de EDS. As amostras foram coladas nos suportes de SEM com fita-cola de carbono. As amostras foram por fim todas revestidas com uma camada de carbono à superfície.

3.4. Microscopia eletrônica de transmissão - TEM

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM do inglês *Transmission Electronic Microscopy*) é uma técnica de imagem na qual uma amostra ultra fina é atravessada por um feixe de eletrões. A interação dos eletrões que são transmitidos através da amostra forma uma imagem que é focada e ampliada num dispositivo de aquisição de imagem presente no equipamento. Este tipo de microscopia tem a capacidade de adquirir imagens de elevada resolução, sendo mesmo possível visualizar uma simples coluna de átomos [97].

Através de TEM foram analisados o tamanho e morfologia dos componentes do scaffold e o padrão de difração eletrónico da HAp. Para esta análise foi utilizado um microscópio JEOL FEG 3000 a 300 kV (Cs 0,6 mm e resolução de 1,7Å) da Universidade Complutense de Madrid.

3.5. *Espetroscopia Raman*

Na espectroscopia Raman faz-se incidir um feixe de fótons na superfície da amostra e como consequência podem acontecer dois fenómenos: os fótons dispersos têm a mesma energia que os fótons incidentes, dando-se colisão elástica, ou os fótons dispersos têm energia maior ou menor que os incidentes, dando-se a colisão inelástica. Estas diferenças de energia são detetadas pela espectroscopia Raman criando assim um espectro de estados vibracionais [99].

O equipamento utilizado neste trabalho foi um micro raman em modo de retrodispersão *Jobin Yvon (Horiba, Japan)* modelo *HR800* com um laser *Quantum* modelo *Ventus* com um comprimento de onda (λ) de 532 nm.

As condições de aquisição utilizadas foram realizadas com uma íris de 250 μm , uma rede de difração de 1800 linhas por mm, objetiva de 50x, resolução de 5cm^{-1} e uma exposição de 20s com 2 exposições (2x20s). O varrimento foi realizado entre os 200 e os 1800cm^{-1} .

3.6. *Porosimetria por intrusão de mercúrio/ azoto - N_2*

A determinação da porosidade total, a distribuição de tamanho de poro, assim como medidas de área superficial foram realizadas através das técnicas de porosimetria por intrusão de mercúrio e de azoto (N_2).

A porosimetria de mercúrio e a adsorção gasosa de N_2 são métodos amplamente aceites quando se pretende a caracterização de sólidos porosos relativamente ao tamanho de

poro, distribuição de tamanho de poro, volume de poro e área superficial específica. As duas técnicas complementam-se pois a porosimetria por intrusão de N_2 faz a medição de microporos e mesoporos enquanto, que a técnica que utiliza mercúrio mede os macroporos.

O princípio da técnica da porosimetria de mercúrio baseia-se no facto de este ser um líquido não molhante, sendo necessário aplicar pressão para que este penetre nos poros. Assim, através da medida da pressão efetuada e do volume de mercúrio que passa pelo poro, pode-se calcular o tamanho deste. Esta técnica mede o tamanho de poro no intervalo de aproximadamente 1-300 μm

Relativamente à porosimetria por N_2 , os valores de área superficial obtêm-se quando há a através da adsorção de uma monocamada de N_2 à superfície, enquanto que o volume de poro e da distribuição de tamanho dos poros é calculado através do princípio da condensação capilar. O tamanho médio de poro medido por esta técnica está situado no intervalo de 1 nm a 1 μm

Para a porosimetria de mercúrio foi utilizado um equipamento *Micromeritics (Norcross, GA) AutoPore IV 9500*. Quanto às medições de área de superfície dos materiais através da técnica de adsorção / dessorção por azoto pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET), estas foram conduzidas com uma temperatura de 77 K, utilizando um porosímetro *ASAP 2020 (Micromeritics Co., Norcross, GA, EUA)*. Antes da análise das amostras estas foram desgaseificadas a 80° C durante 24h, sob condições de vácuo inferiores a 10^{-5} Torr.

Ambas as análises foram efetuadas na universidade Complutense de Madrid.

3.7. Resistência mecânica à compressão

A resistência à compressão é a tensão de compressão máxima que um material é capaz de suportar, sem fraturar. Os ensaios de compressão são conduzidos através da aplicação de forças compressivas na amostra, situada entre duas placas, obtendo-se assim curvas de deformação *versus* carga aplicada (Fig. 23).

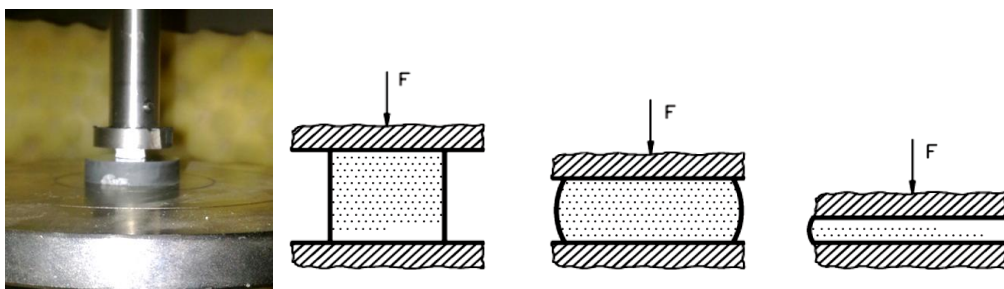


Fig. 23 – Dispositivo de compressão utilizado nos ensaios e figuras ilustrativas de um ensaio de compressão.

A avaliação do comportamento mecânico dos *scaffolds* é importante, pois o osso é um componente sujeito a grandes forças de compressão, precisando assim o scaffold de possuir boas propriedades para suportar estas mesmas forças [100].

Para traçar a curva de tensão/deformação nominal experimental foi necessário calcular, a partir dos valores de força e deslocamento obtidos durante os ensaios, os respectivos valores de tensão e da extensão nominal. A tensão nominal é determinada através do quociente entre a força aplicada e a área de secção transversal à direção da força aplicada, através da seguinte expressão:

$$\sigma(MPa) = \frac{F}{A_0} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde F é a força de compressão uniaxial e A_0 é a área inicial de superfície que suporta a força aplicada, assumindo que todos os corpos iniciais tinham um diâmetro de 6mm.

A extensão nominal corresponde à medida de deformação longitudinal do material, obtida pela divisão da variação da altura pela altura inicial:

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h_0} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde a variação de altura é dada por $\Delta h = h - h_0$ e h_0 é a altura inicial real. Para estes valores de deformação aparecerem em forma de % o resultado obtido foi multiplicado por 100.

Os valores de resistência à compressão foram calculados através da equação 4:

$$RC = \frac{F_{m\acute{a}x}}{S_0} \quad \text{Eq. 4}$$

Em que RC é existência à compressão, $F_{\text{máx}}$ a tensão nominal e S_0 – área de secção nominal inicial. Esta expressão corresponde, como se pode observar, à tensão nominal calculada.

Os ensaios de compressão foram realizados para três amostras de cada composição, num equipamento de ensaios mecânicos Zwick / Roell Z20, com uma velocidade de 0,5mm/min.

3.8. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) possibilita a identificação de grupos funcionais em compostos orgânicos e inorgânicos. Esta técnica tem como princípio base o facto de as ligações químicas vibrarem segundo frequências específicas, ocorrendo estas na região do infravermelho do espectro eletromagnético [97].

Efetuuou-se a análise do compósito, obtendo um espectro de grande complexidade devido a sobreposição de picos. Para fazer a correta atribuição dos grupos existentes foi realizada a análise de FTIR aos compostos isolados.

Para o estudo foi utilizado o equipamento *PerkinElmer spectrum BX* com um *ATR golden gate da Specac* do Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Os parâmetros utilizados foram uma resolução de 8 cm^{-1} , com uma velocidade de aquisição de 64 scans por minuto.

3.9. Propriedades elétricas

Para melhor compreender a influência da carga de CNTs na condutividade das amostras, realizou-se o estudo das propriedades elétricas.

Ao submetemos o material a uma diferença de potencial, V , gera-se uma corrente elétrica, I , que depende da resistência elétrica do material, R . Este estudo baseou-se na aplicação da Lei de *Ohm*:

$$I = \frac{V}{R} \Leftrightarrow R = \frac{V}{I} \quad \text{Eq. 5}$$

Desta forma, foram estabelecidos dois contactos elétricos na amostra com cola de prata onde foram aplicados fios elétricos e uma resistência de $47000\ \Omega$, que teve como papel medir a corrente no circuito de forma indireta. O contacto elétrico com as amostras e o esquema de montagem do circuito está esquematizado na Fig. 24.

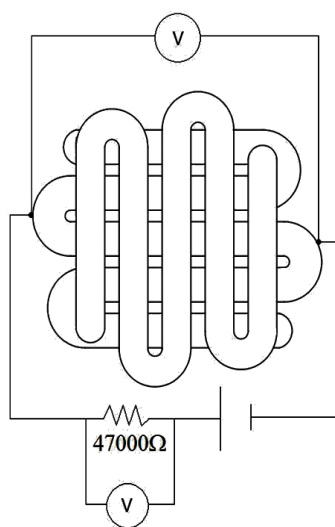


Fig. 24 – Esquema do circuito efetuado para a medição elétrica nas amostras.

As medições foram realizadas ao ar, à temperatura ambiente e a tensão aplicada foi com intervalos de $0,1\text{ V}$, entre os valores de -10 e 10V , com 1s de tempo de intervalo.

Para realizar os testes, foi utilizado um equipamento desenvolvido pelo grupo, o *home-made Van der Paw device*, que está ligado a uma placa de aquisição de dados *National Instruments Ni DAQpad – 6015* com 16 bit de resolução e a um computador equipado com um software também desenvolvido pelo grupo baseado na plataforma *DasyLab*.

3.10. Estudos de bioatividade

A inserção de um implante no corpo humano leva ao estabelecimento de interações com o meio envolvente. Para avaliar e ajudar a prever estas interações recorre-se a ensaios de bioatividade *in vitro*. Estes têm como objetivo a avaliação da reatividade superficial de materiais, quando imersos num fluido que simula o plasma humano (*simulated body fluid*-SBF), através da análise das transformações na superfície do material e das alterações das concentrações do fluido de imersão.

Como se sabe, um dos pré-requisitos para um material que se pretende implantar no osso, é a sua capacidade de formação de uma camada de apatite biologicamente ativa na interface com o osso, conhecida como “*bone-like apatite*”. Esta apatite é muito semelhante em termos de composição e estrutura à fase inorgânica presente no tecido ósseo. A sua função é atuar como marcadora de proteínas que desencadeiam uma série de acontecimentos que acabam por resultar na formação da estrutura óssea sobre a camada de apatite formada [63,64].

3.10.1. Preparação da solução de fluido corporal simulado - SBF

A solução de SBF foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Kokubo [101]. Os reagentes usados, a proveniência, o grau de pureza, a quantidade usada para a preparação de 1L de SBF, bem como a ordem de introdução na solução estão indicados na Tabela 6.

Os passos utilizados no procedimento foram os seguintes:

- Colocar 600 mL de água desionizada num copo em banho-maria e com agitação magnética até atingir 36,5°C.
- Pesar os reagentes que se colocam em vidros de relógio devidamente numerados.
- Quando a água se encontrar a 36,5°C, adicionam-se os reagentes muito lentamente com os números de 1 a 5.

- Adicionar o 1M-HCl até obter o pH de aproximadamente 1 e de seguida adicionar os reagentes 6 e 7 também muito lentamente.
- Adicionar o reagente 8 (*tris buffer*) até obter um pH de 7,6.
- Efetuar uma titulação com 1M-HCl até se obter um pH final compreendido entre 7,2-7,3.
- Retificar com água desionizada até perfazer 1L.

Tabela 6 - Ordem, quantidade, fornecedor e pureza dos reagentes usados para a preparação de 1L de SBF.

	Reagente	Marca comercial	Pureza (%)	Quantidade para 1L (g)
1	NaCl	Sigma- Aldrich	99,5	7,996
2	NaHCO ₃	Sigma- Aldrich	99,5	0,350
3	KCl	Sigma- Aldrich	99,5	0,224
4	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	Sigma- Aldrich	99,0	0,228
5	MgCl ₂ . 2H ₂ O	Sigma- Aldrich	98,0	0,305
6	CaCl ₂ . 2H ₂ O	Sigma- Aldrich	95,0	0,368
7	Na ₂ SO ₄	Sigma- Aldrich	99,0	0,071
8	Tris (hidroximetilaminometano)	Sigma- Aldrich	99,0	6,057
	HCl (1M)	Sigma- Aldrich		45 cc/L

A concentração de iões na solução final obtida é semelhante à do plasma humano, como poderemos ver na Tabela 7, abaixo apresentada.

Tabela 7 - Concentração de iões no plasma humano e no SBF [101].

	Concentração iónica (mM)							
Espécies iónicas	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma Humano	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5

3.10.2. Ensaios de imersão

O estudo do comportamento das amostras na solução de SBF envolveu basicamente as seguintes etapas: (1) imersão do scaffold compósito em solução de SBF durante diferentes períodos de tempo, (2) remoção do scaffold da solução de SBF seguida da lavagem do mesmo com água desionizada e (3) caracterização do scaffold e da solução de imersão (Fig. 25)

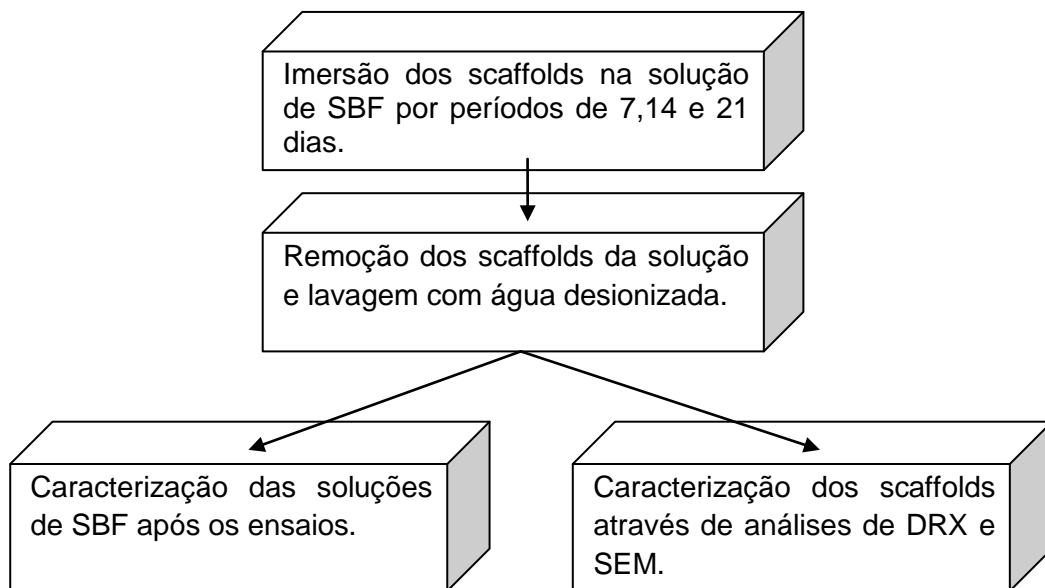


Fig. 25 – Diagrama ilustrativo do procedimento utilizado nos estudos de bioatividade.

O volume (V) de SBF aconselhado por Kokubo [101] para amostras porosas deverá ser maior que o volume V_s calculado para amostras densas. A fórmula utilizada para calcular o volume de imersão nas amostras densas é a seguinte:

$$V_s = S_a / 10 \quad \text{Eq. 6}$$

Onde **V_s** é o volume calculado de SBF (mL) e **S_a** a área superficial aparente (mm²). Estas amostras, de aproximadamente 120 mm² de área superficial aparente, foram mergulhadas em 15 mL de SBF em copos de polietileno.

Os copos foram fechados e colocados num banho com uma temperatura constante de 37°C, durante diferentes tempos de imersão já supracitados.

Após períodos de tempo preestabelecidos, removeram-se as amostras da solução de SBF, procedendo-se à sua lavagem com água desionizada e posterior caracterização.

3.10.3. Caracterização do SBF residual após os ensaios de imersão por espectroscopia de emissão de plasma induzido (ICP)

A análise do SBF residual, de cada tempo de imersão, foi efetuada pelo Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro, através de ICP (do inglês *Inductively Coupled Plasma emission spectroscopy*) utilizando um espectómetro *Jobin Yvon 70 Plus*.

Esta análise permitiu seguir a variação das concentrações iónicas de cálcio e fósforo ao longo dos diversos tempos de imersão.

3.11. Testes de biocompatibilidade celular

Foram realizados testes *in vitro* com culturas de células tumorais procedentes de osteosarcoma (osteoblast like cell) da linha MG-63.

Para os ensaios de citocompatibilidade as células foram cultivadas por 6 dias, a 37 ° C, numa atmosfera humidificada de 5% CO₂/ar em alfa-MEM (do inglês *alfa-Minimum Essential Medium*) com 10% de soro fetal bovino, 100 µg / ml de penicilina, 10 UI de estreptomicina, 2,5 mg / ml de fungizona. Para a subcultura, a monocamada de células foi lavada duas vezes com PBS (do inglês *Phosphate buffered saline*) e foram posteriormente incubadas com uma solução de tripsina-EDTA (tripsina a 0,05%, 0,25% de EDTA - Etileno-diamina-tetra-acético) durante 10 min a 37 ° C para separar as células. O efeito da tripsina foi de seguida inibido pela adição do meio de cultura a 37 ° C. A suspensão de células foi semeada (10⁵ células/cm²) sobre as amostras de material.

Todas as amostras foram observadas por SEM. Para tal, as amostras foram fixadas (1,5% de glutaraldeído em cacodilato de sódio 0,14 M, 10 min), desidratadas por uma série graduada de álcoois, e depois secas com hexametildisilazano. As amostras foram

montadas em suportes de alumínio, super-revestidos com ouro, e observadas num microscópio eletrónico de varrimento JSM JEOL A 35°C equipado com um sistema de EDS voyager XRMA System da Noran Instruments.

Capítulo III

Resultados e discussão

Resultados e discussão

Neste capítulo são expostos os resultados do trabalho experimental realizado, apresentando-se uma breve discussão à medida que os mesmos forem apresentados.

O capítulo inicia com a apresentação dos estudos de caracterização morfológica e microestrutural dos compósitos, seguindo-se a análise química e física dos mesmos. Apresentam-se também os estudos de bioatividade e biocompatibilidade.

1. Caracterização morfológica e estrutural

1.1. Análises de SEM, TEM e de porosimetria

A avaliação da microestrutura, de todos os corpos produzidos foi avaliada por SEM e TEM.

A Fig.26 mostra imagens de SEM de baixa ampliação e de microscopia ótica da estrutura e morfologia dos *scaffolds*.

Nas micrografias de SEM verificou-se que os *scaffolds* consistem numa matriz reticulada constituída por várias camadas sobrepostas de fios extrudidos. Na vista de topo observou-se que os poros têm um tamanho entre os 450 e os 700 μm (medidos através do software *ImageJ*) em ambas as suas medidas geométricas (X e Y).

Apesar de se verificar nas micrografias de vista de topo que a geometria de poro é regular nas dimensões X e Y pode-se verificar que a abertura dos poros dos *scaffolds* não é igual na dimensão Z. Isto deve-se ao facto de as superfícies que pertencem à direção Z do scaffold, serem formadas pela região em que as fieiras de material dobras e vão sendo, sucessivamente, depositadas umas sobre as outras, sendo o tamanho de poro restrito ao da camada de material que fica no meio. No entanto, este facto não impede que haja uma boa interconectividade entre a rede de poros.

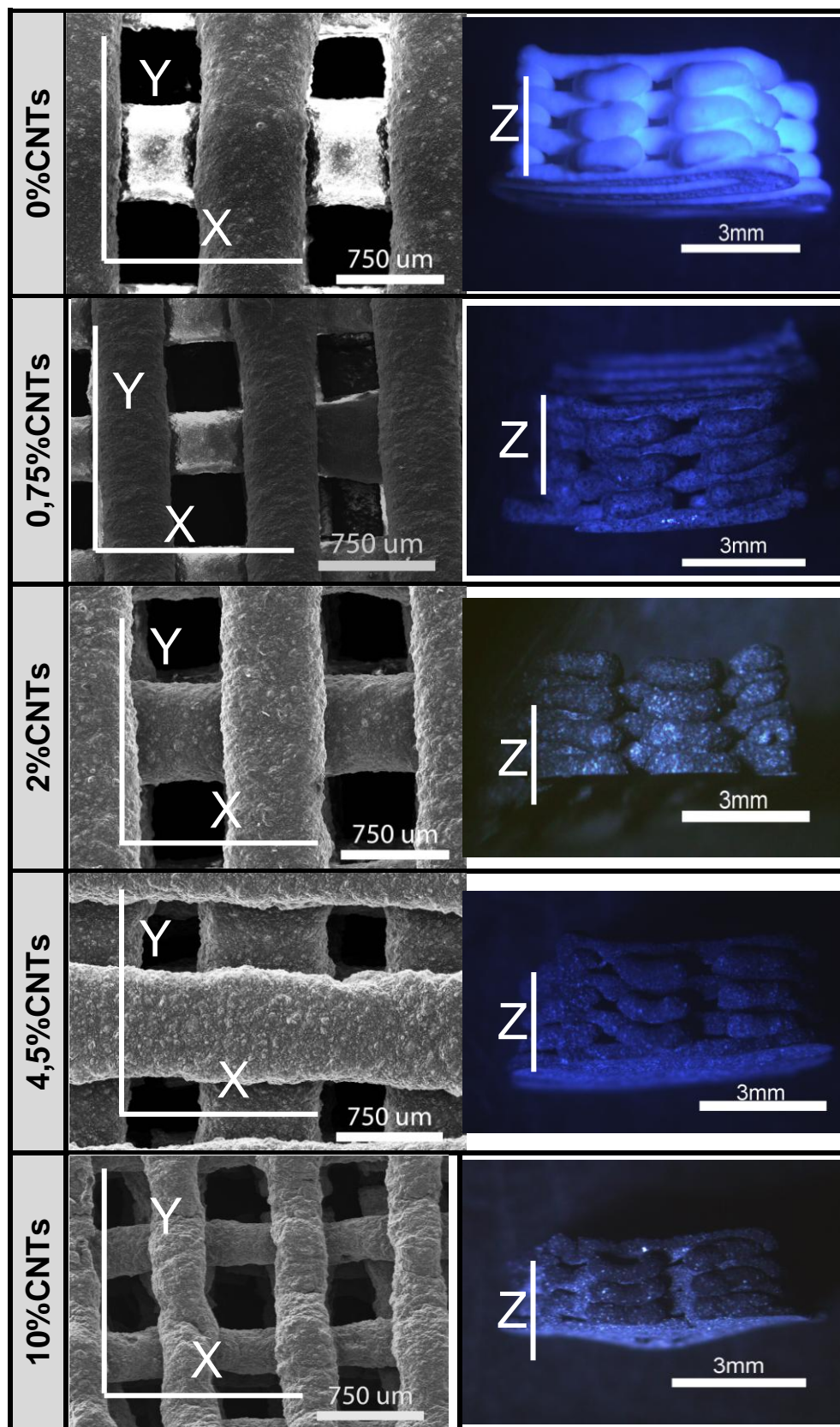


Fig. 26 - Micrografias obtidas dos diferentes *scaffolds* produzidos.

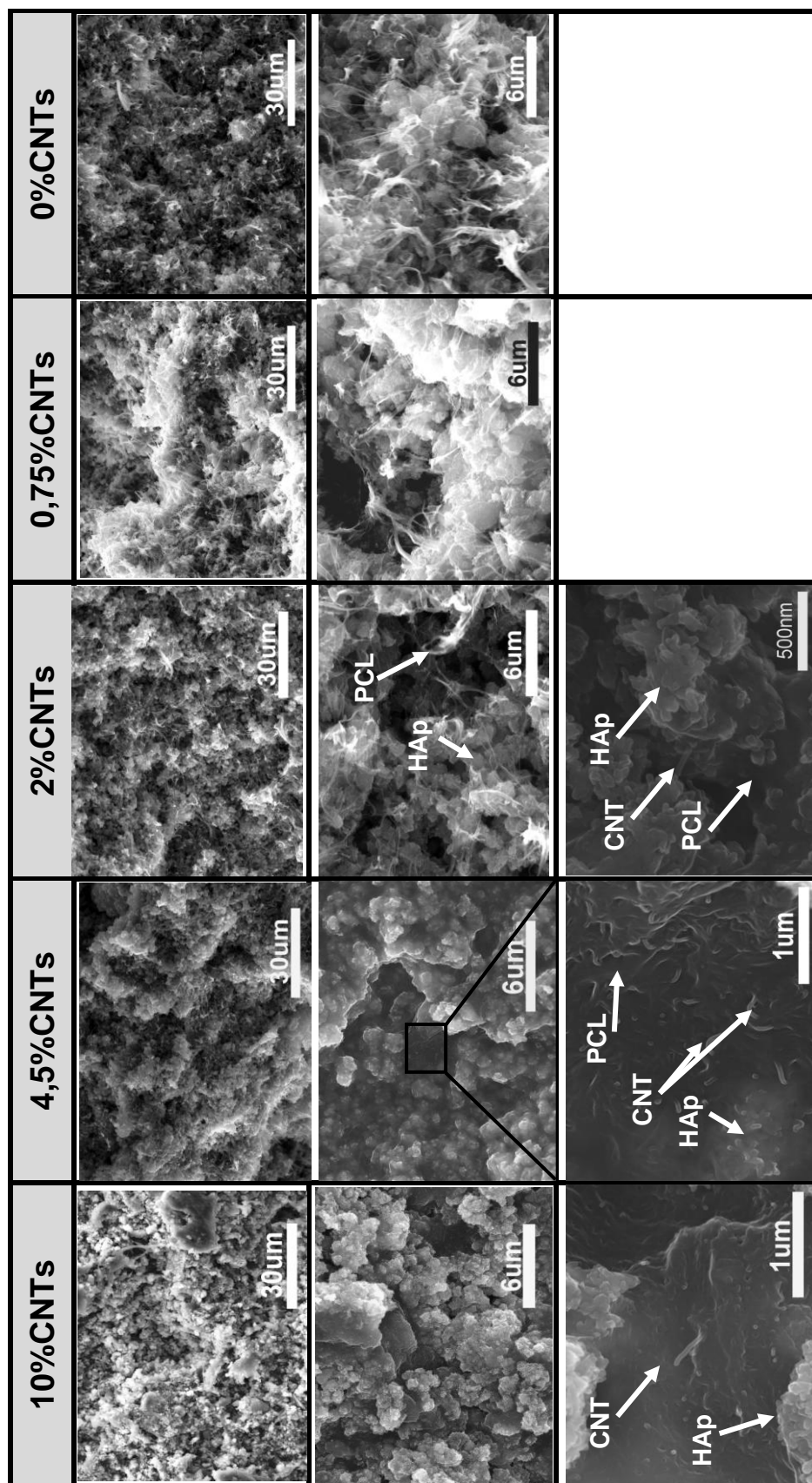


Fig. 27 – Micrografias de SEM das regiões de fratura dos *scaffolds* produzidos.

É de salientar, antes de mais, que a visualização de CNTs apenas se tornou evidente para as amostras com formulações iguais e superiores a 4,5% de CNTs, observando-se no entanto também, com mais dificuldade, uma região nas amostras com 2%.

Analisando a Fig. 27 relativa à estrutura dos *scaffolds* nas regiões de fratura, observou-se em menores ampliações que a HAp, assim como os CNTs se encontram homogeneamente dispersos sobre a fase polimérica, sugerindo que esta está a fazer o papel de matriz que liga as fases inorgânicas dispersas pelo compósito. No entanto, verificou-se que estes (HAp e CNTs), a nível micrométrico, não estão dispostos de forma homogênea pois observou-se regiões de aglomerados quer de HAp quer de CNTs no seio da matriz polimérica.

Para identificar os materiais presentes nas imagens de SEM realizaram-se análises de EDS (Fig. 28). Na HAp identificaram-se picos de cálcio, oxigénio, fósforo e também de silício presente na substituição na rede da HAp. Já na PCL foram identificados os elementos de carbono e oxigénio, verificando-se também pequenos picos na região do fósforo e cálcio consequentes da sobreposição desta na HAp.

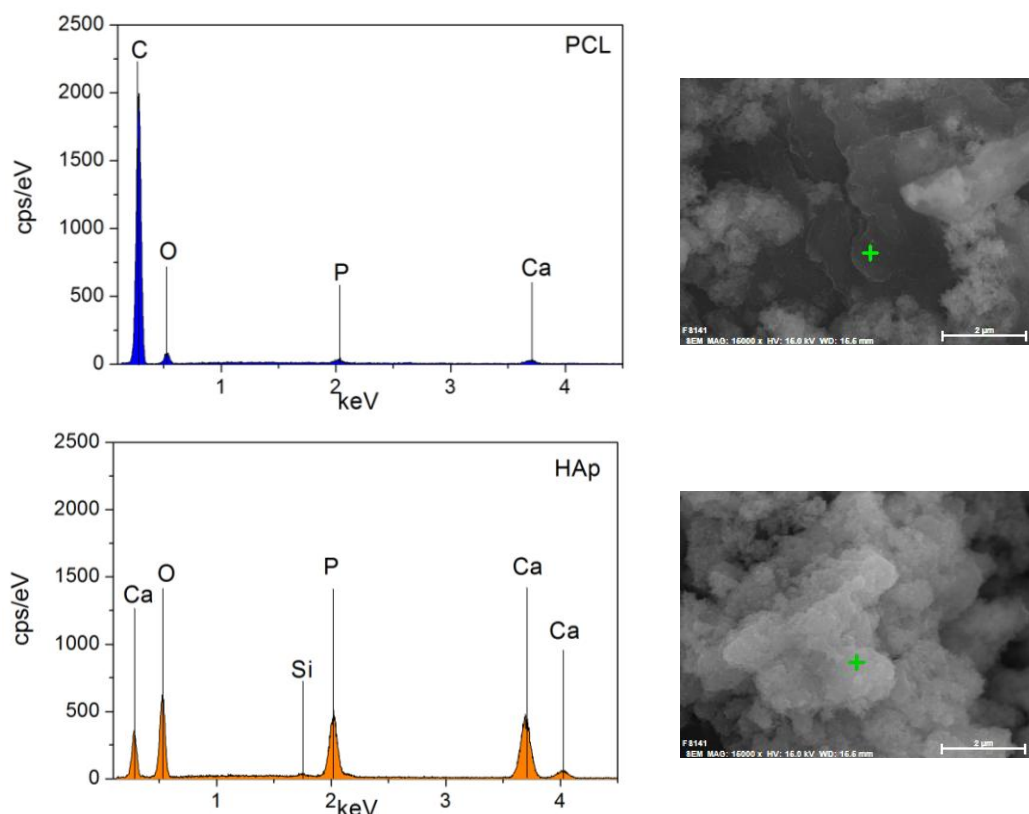


Fig. 28 – Espectro de EDS e regiões de aquisição num *scaffold* com 4,5 % de CNTs na sua composição.

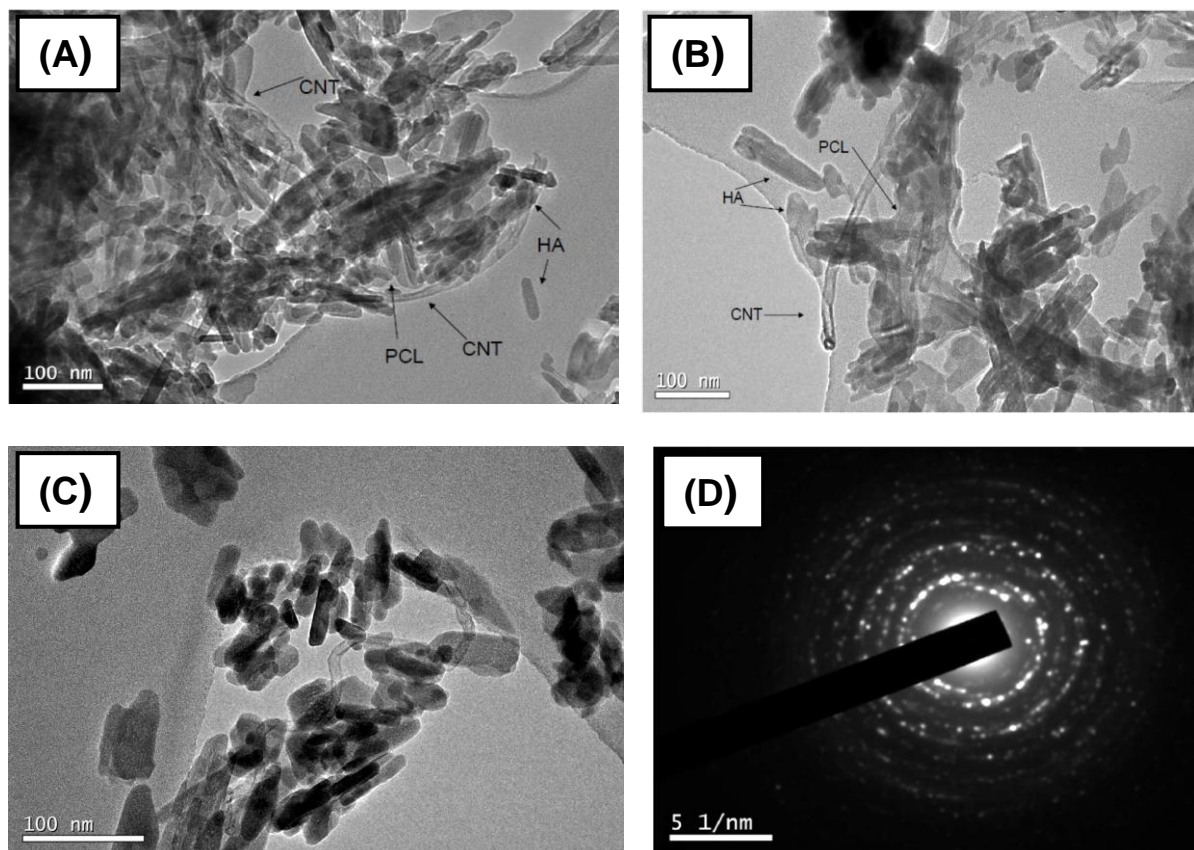


Fig. 29 - Micrografias de TEM (A, B e C) e padrão de difração eletrônica da HAp (D).

Na Fig.29, relativa às imagens de TEM, visualizam-se todas as estruturas presentes. Os CNTs aparecem como tubos de centro oco, com um diâmetro exterior a variar entre os 10 e os 15 nm. Já a HAp, apresenta-se como partículas de forma aciculares (com orientação preferencial), sendo estas compostas por uma gama de tamanhos entre os 10-35 nm para a largura e 25- 100 nm para o comprimento. No seu padrão de reflexão eletrónico (Fig. 29 D) podem-se observar anéis de cristalinidade característicos de uma estrutura nanocristalina.

Para avaliar o tamanho médio de poro e a percentagem de porosidade, foram efetuadas análises por porosimetria por intrusão de mercúrio. Os resultados obtidos encontram-se representados nas Fig. 30 e 31. De referir que para as composições com CNTs, independentemente da % de CNTs, os valores obtidos foram em todos similares, tendo sido incluído apenas um gráfico representativo de todos eles.

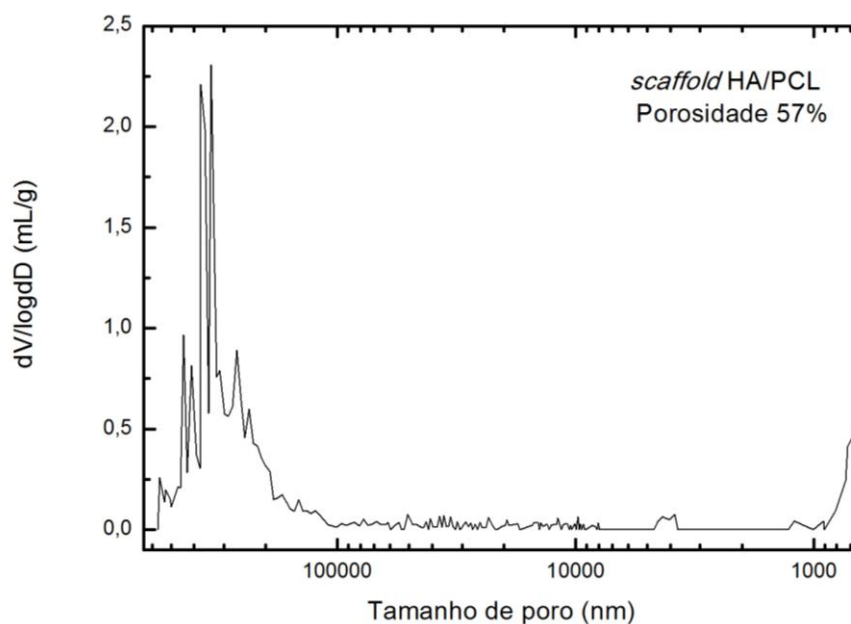


Fig. 30 - Gráfico representativo das medidas de porosimetria nos *scaffolds* de HA/PCL.

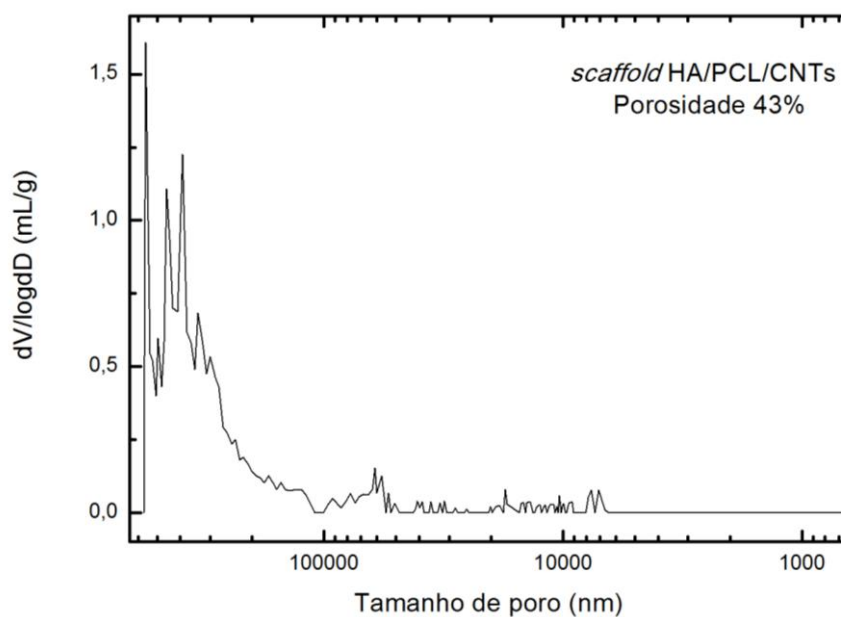


Fig. 31 - Gráfico representativo das medidas de porosimetria em todos os *scaffolds* de HA/PCL/CNTs.

Com base nos gráficos determinaram-se os valores de porosidade total no intervalo de 1-300 μm , sendo estes de 57% para os *scaffolds* com 0% de CNTs e de 43% para os *scaffolds* que incorporavam CNTs. Os picos máximos de tamanho de poro são para os dois casos de 300 μm (tamanhos maiores foram observados no SEM para completar os

limites de intervalo da técnica de intrusão de mercúrio), tendo algumas pequenas contribuições de tamanhos menores.

Além dos dados da porosimetria por intrusão de mercúrio foram ainda realizadas medidas por porosimetria de N₂ (Fig.32) para avaliar a porosidade na gama do mesoporo.

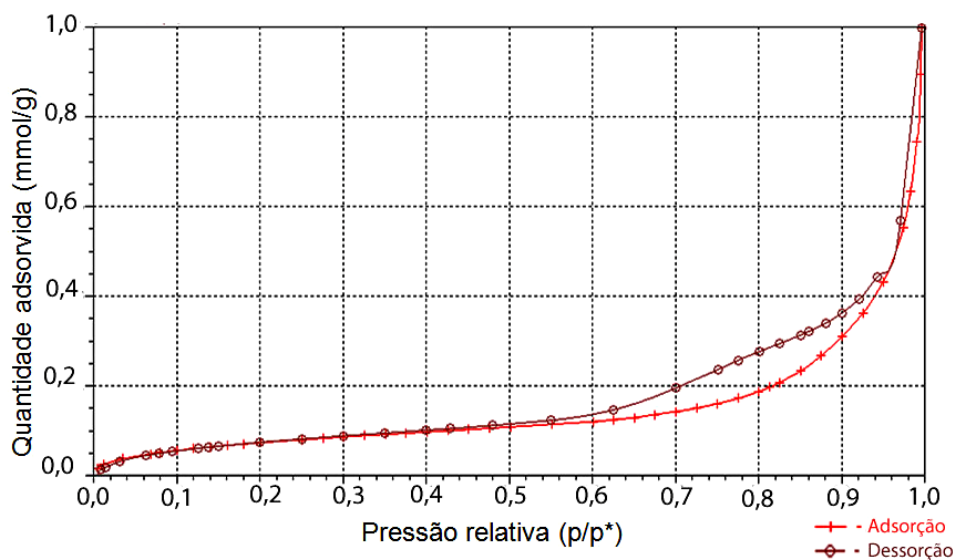


Fig. 32 - Isotérmica de adsorção – dessorção representativa dos compósitos de HA/PCL/ CNTs.

Foi obtido um valor de área de superfície de Brunauer, Emmett and Teller (BET) de 6.44 m²/g para o caso das amostras que incorporavam CNTs e um tamanho médio de poro de 215 Å, no entanto para o caso dos 0% de CNTs praticamente não foram detetados resultados nesta gama de valores.

2. Caracterização composicional

Para caracterizar estruturalmente os compostos foram efetuadas análises de DRX, FTIR e Raman.

2.1. Análise de DRX

Os difractogramas da Fig. 33 correspondem aos materiais utilizados na preparação dos *scaffolds*.

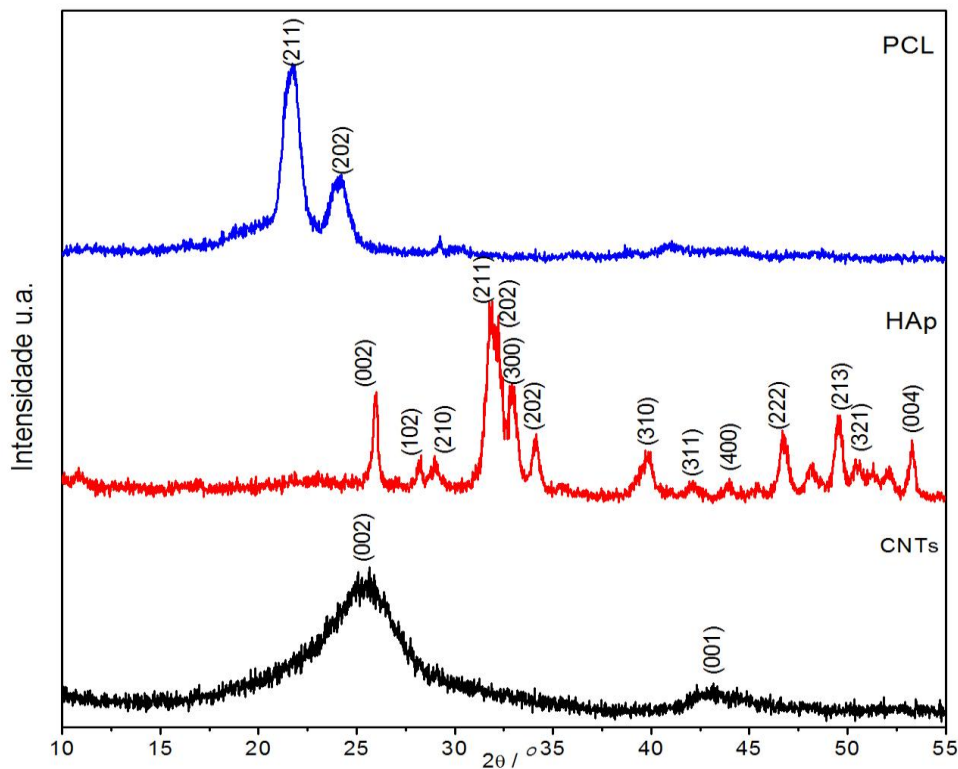


Fig. 33 – Difractogramas de raios-X dos materiais utilizados no fabrico dos *scaffolds*.

O difractograma superior corresponde à PCL, um polímero semicristalino, onde se observam os máximos de difração correspondentes à estrutura da PCL, aos $2\theta = 21,7^\circ$ e $24,1^\circ$, derivados dos planos (110) e (200), respetivamente [103]. No difractograma

intermédio apresenta-se a HAp utilizada, confirmando-se a sua pureza pela ausência de máximos adicionais correspondentes a outras fases cristalinas. Por último, está representado o padrão de DRX dos CNTs apresentando dois máximos de difração aos $2\theta = 26^\circ$ e 47° .

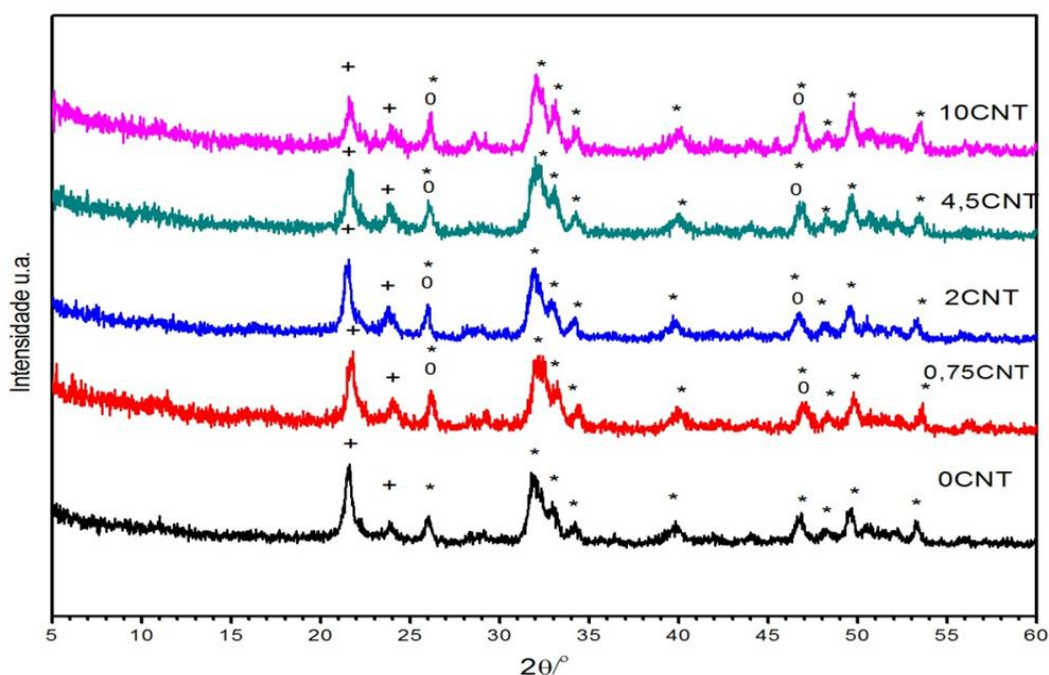


Fig. 34 - Espectros de DRX dos *scaffolds* compósitos. + - PCL, 0 – CNTs, * - HAp.

Nos espectros pertencentes aos compósitos produzidos (Fig.34) não se observam máximos de difração pertencentes a outros compostos, estando presentes apenas os correspondentes aos materiais iniciais concluindo-se, que o procedimento utilizado para o fabrico das pastas não levou à formação de novos compostos.

2.2. *Análise da espectroscopia FTIR*

Através da análise dos espectros procurou-se analisar quais as vibrações envolvidas, tal como atribuir os grupos químicos relacionados a estas transições.

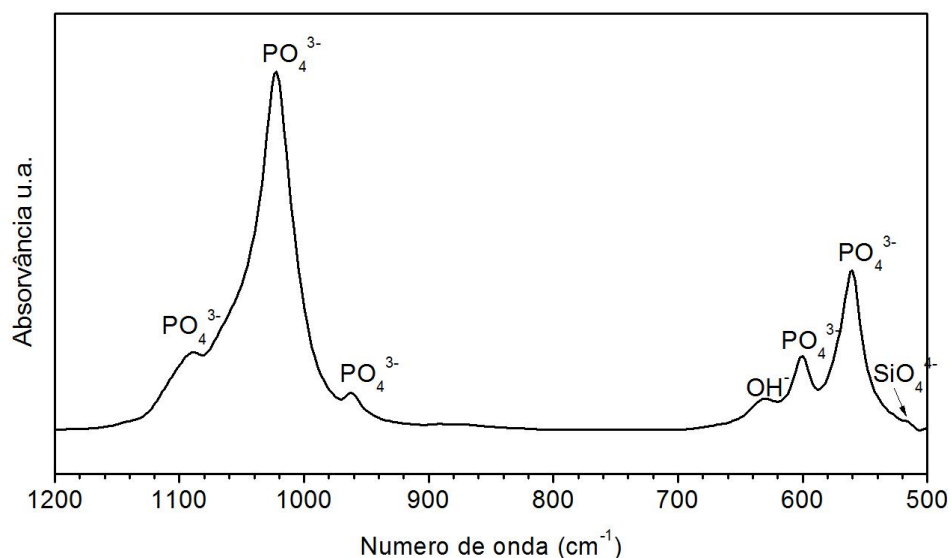


Fig. 35 - Espectro de FTIR da HAp.

A Fig. 35 mostra o espectro de FTIR efetuado ao pó de HAp, revelando que esta possui uma composição típica de apatite, observando-se aos 1088, 1022, 961, 600 e 560 cm^{-1} as bandas principais correspondentes aos grupos fosfato PO_4^{3-} e aos 630 cm^{-1} , a banda correspondente ao grupo hidroxilo OH^- . Estas contribuições são características de compostos de fosfato de cálcio e os seus valores estão de acordo com a literatura [104]. Além das bandas típicas dos grupos fosfato e hidroxilo, deteta-se ainda uma banda adicional aos 515 cm^{-1} que pode ser atribuída aos grupos SiO_4^{4-} presentes na rede da HAp utilizada [105].

Tabela 8 - Bandas de infravermelhos, características da HAp.

Frequência de vibração (cm^{-1})	Ligações e modos de vibração associados
630	OH^-
1088	PO_4^{3-}
1022	
961	
600	
560	
515	SiO_4^{4-}

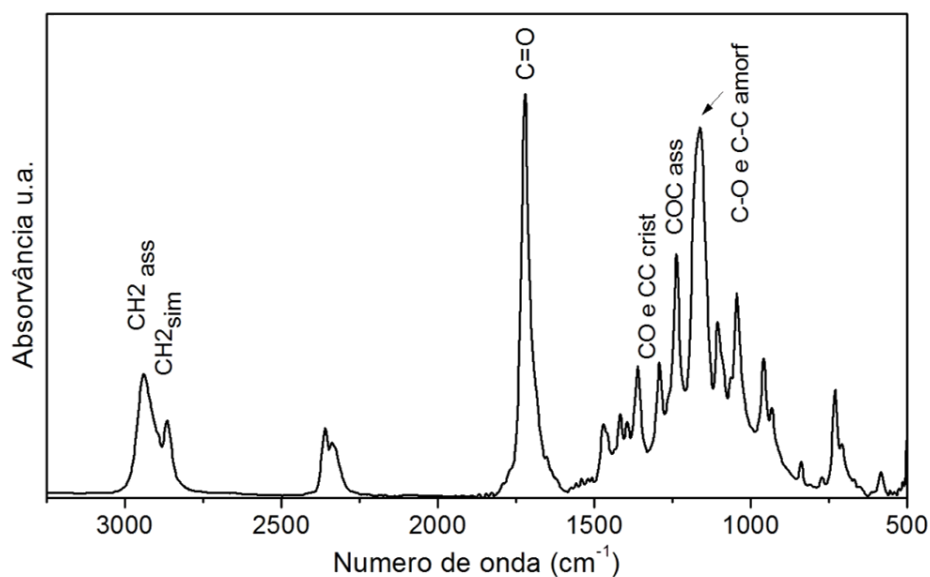


Fig. 36 - Espectro de FTIR da PCL.

Em relação ao espectro da PCL (Fig. 36), pode-se identificar facilmente a banda mais forte, correspondente ao grupo carbonilo (-C=O) por volta de 1727 cm^{-1} . A banda em 1292 cm^{-1} é atribuída as ligações C-C e C-O, modos de estiramento na PCL cristalina e a banda nos 1159 cm^{-1} às ligações C-C e C-O da fase amorfa na PCL.

Na Tabela 9 são apresentadas as frequências das vibrações observadas e as ligações e os modos de vibração correspondentes.

Tabela 9 - Bandas de infravermelhos (IV), características da PCL [106].

Frequência de vibração (cm^{-1})	Ligações e modos de vibração associados
2942	CH2 assimétrica
2864	CH2 Simétrica
1722	C=O - grupo carbonilo
1292	C–O e C–C na fase cristalina
1237	COC assimétrica
1159	C–O e C–C da fase amorfa

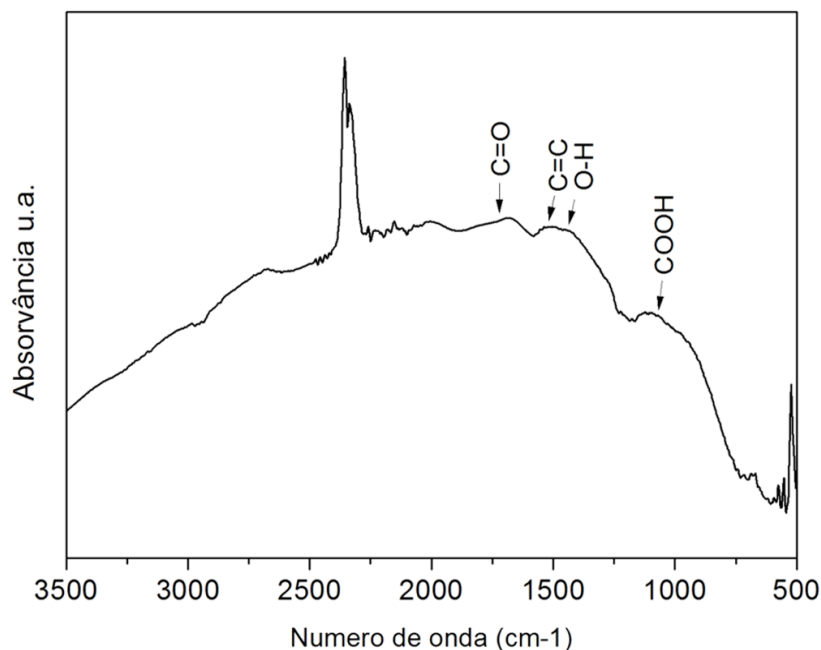


Fig. 37 – Espectro de FTIR relativo aos CNTs purificados e funcionalizados com o grupo COOH.

Relativamente ao espectro de FTIR dos CNTs utilizados representado na Fig. 37, podemos visualizar discretos máximos de intensidade aos 1073, 1436 e 1721 cm^{-1} relativos às bandas de -COOH , O-H e C=O do grupo carboxílico, respetivamente. Estas bandas dizem respeito aos grupos resultantes da funcionalização dos CNTs. Quanto à banda com um máximo de 1540 cm^{-1} C=C, esta corresponde às ligações da estrutura base dos CNTs, demonstrando que estes mantiveram a sua estrutura mesmo após a funcionalização [107,108].

Tabela 10 - Bandas de infravermelhos dos CNTs.

Frequência de vibração (cm^{-1})	Ligações e modos de vibração associados
1721	C=O
1540	C=C
1436	O-H
1073	-COOH

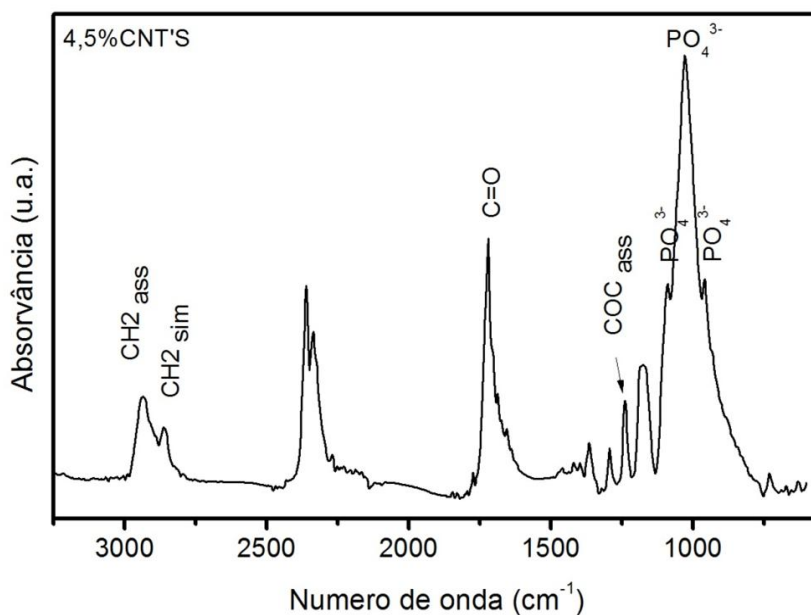


Fig. 38 - Espectro de FTIR da estrutura compósita de 4,5% de CNTs.

O espectro de FTIR da composição de 4,5% CNTs (Fig. 38) apresentado é representativo de todos os *scaffolds* com CNTs na sua composição, pois entre eles, não haviam diferenças significativas. Verificou-se que as bandas presentes no espectro são relativas às contribuições da HAp e da PCL não se observando máximos pertencentes aos CNTs, possivelmente devido à sobreposição de bandas. Observam-se os máximos já identificados na HAp referentes aos grupos PO_4^{3-} entre os 1090 e os 961 cm^{-1} . Em relação à contribuição da PCL, verificamos a presença bem marcada do máximo referente ao grupo carbonilo aos 1722 cm^{-1} e também das bandas pertencentes ao CH_2 simétrico e assimétrico e COC assimétrico com valores já referenciados anteriormente.

2.3. Análise da espectroscopia Raman

Para uma melhor caracterização da estrutura do compósito foram efetuadas análises de RAMAN.

Apesar de a visão macroestrutural ser homogênea, na análise inicial de Raman verificou-se que existiam zonas de heterogeneidade microestrutural, e por isso foram feitas várias

análises em diferentes zonas dos compósitos. Para fazer a correspondência das bandas, foram igualmente realizadas análises aos compostos precursores dos *scaffolds*.

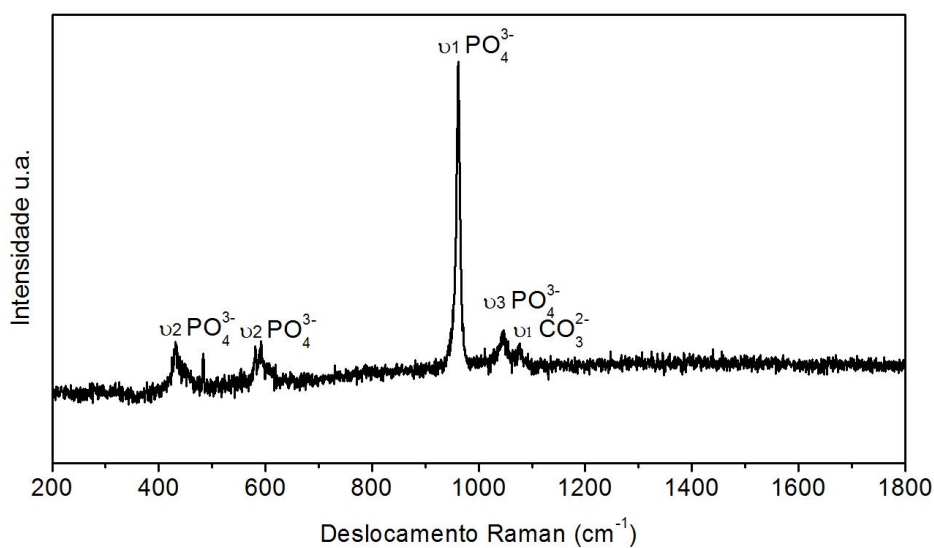


Fig. 39 - Espectro de Raman da HAp

No espectro referente à HAp (Fig. 40) verificou-se a existência de bandas com valores de 431, 591, 961, 1045, 1076 cm⁻¹ referentes aos diferentes modos vibracionais dos grupos fosfato.

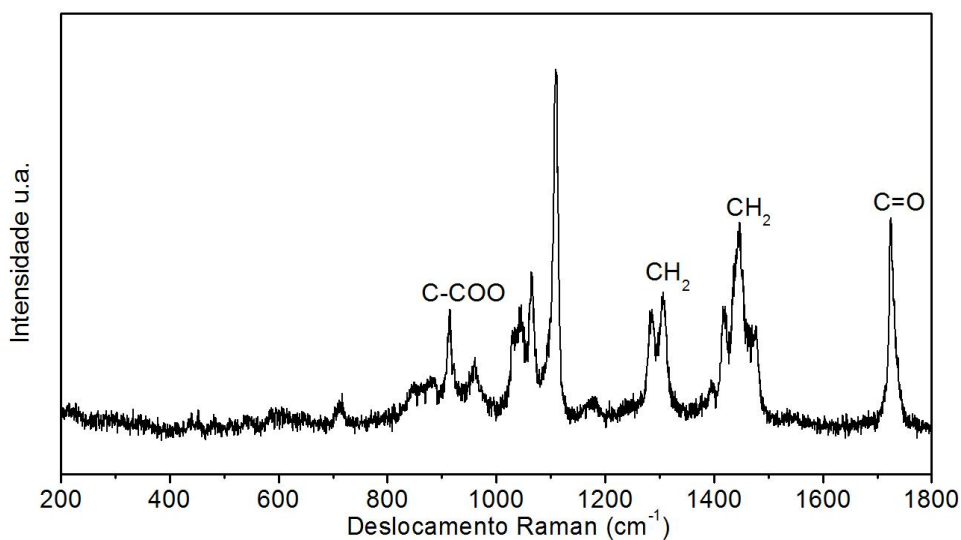


Fig. 40 - Espectro de Raman da PCL

No espectro da PCL (Fig. 40), observou-se a presença de diversas bandas características nomeadamente na banda dos 1720 cm^{-1} atribuída ao grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$). Existem outras contribuições entre $1418\text{--}1480$ e $1287\text{--}1308\text{ cm}^{-1}$ referentes ao CH_2 , nos $1107\text{--}1033$ ao alongamento do esqueleto da PCL e na banda dos 913 cm^{-1} à ligação C-COO . Estes modos vibracionais foram encontrados de forma semelhante no espectro de FTIR.

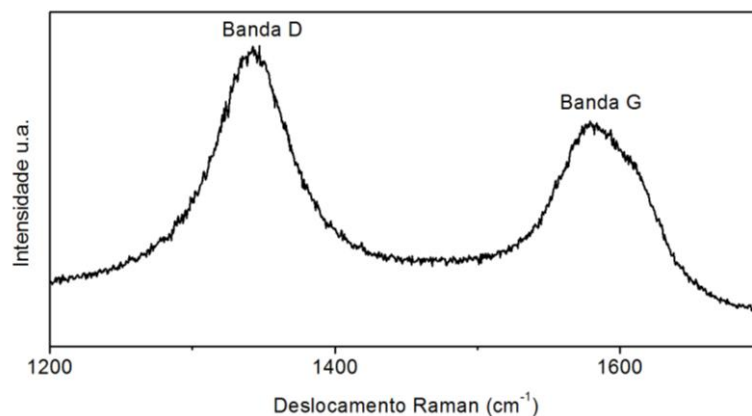


Fig. 41 - Espectro de Raman dos CNTs utilizados, purificados e funcionalizados com o grupo $-\text{COOH}$.

A Fig. 41 apresenta o espectro de Raman relativo aos CNTs purificados e funcionalizados utilizados. O espectro apresenta-se com duas bandas características destas estruturas, 1342 e 1582 cm^{-1} , correspondentes às bandas D e G, respetivamente. A banda D representa os defeitos e as estruturas de grafite desordenada enquanto que a banda G é atribuída à grafite cristalina.

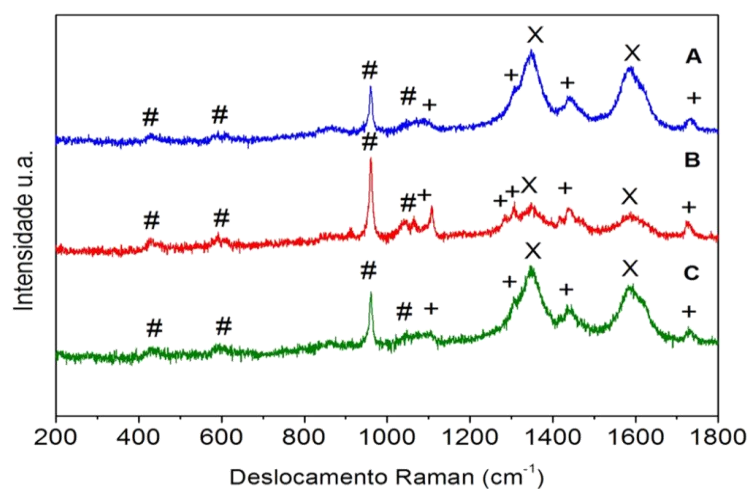


Fig. 42 - Espectro Raman de diferentes zonas do compósito de composição 10 % CNTs. # - HAp, + - PCL e X- CNTs

Analisando o espectro de Raman do compósito com 10%CNTs em três regiões distintas (Fig. 42), observou-se que existem zonas em que há compostos mais predominantes, resultantes da heterogeneidade microestrutural observada. No entanto, em todos os gráficos, apesar das diferenças de intensidades, verifica-se a presença de picos de todos os compostos, o que significa que existem regiões em que os compostos estão bem dispersos entre si. É de interesse referir que o mesmo foi observado em todos os compósitos produzidos, no entanto optou-se por apresentar apenas um dos gráficos a título representativo.

3. Caracterização Física

As análises físicas efetuadas compreenderam as análises de TG/ATD, caracterização mecânica e elétrica.

3.1. Análises térmicas diferencial e termogravimétrica simultâneas (DTA/TG)

Foram realizadas análises DTA/TG com o intuito de confirmar a composição das amostras. Os resultados obtidos estão descritos nos gráficos seguintes:

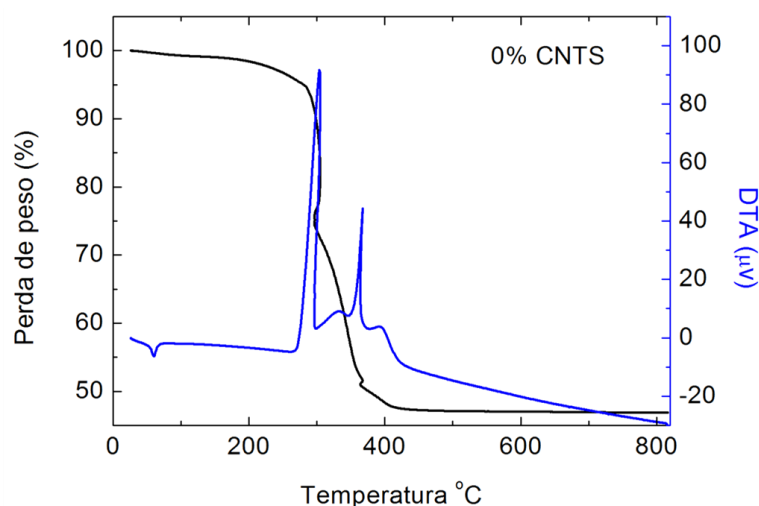


Fig. 43 - Análise termogravimétrica da PCL para a composição com 0%CNTs.

Inicialmente, no gráfico (Fig. 43) verificou-se uma perda de massa nos primeiros 200°C relativa à evaporação da água. Por volta dos 260°C o perfil termogravimétrico mostrou que a percentagem de peso da PCL começou a diminuir à medida que a temperatura aumentava. Quando se chegou aos 400°C a PCL foi completamente decomposta. Esta perda de massa corresponde a cerca de 50% total do material, coincidindo com a percentagem inicial na preparação da suspensão.

Por outro lado, no perfil DTA, aos 60°C pode-se observar uma reação endotérmica correspondente ao ponto de fusão da PCL e duas reações exotérmicas aos 300 e 370° C devido à decomposição da mesma.

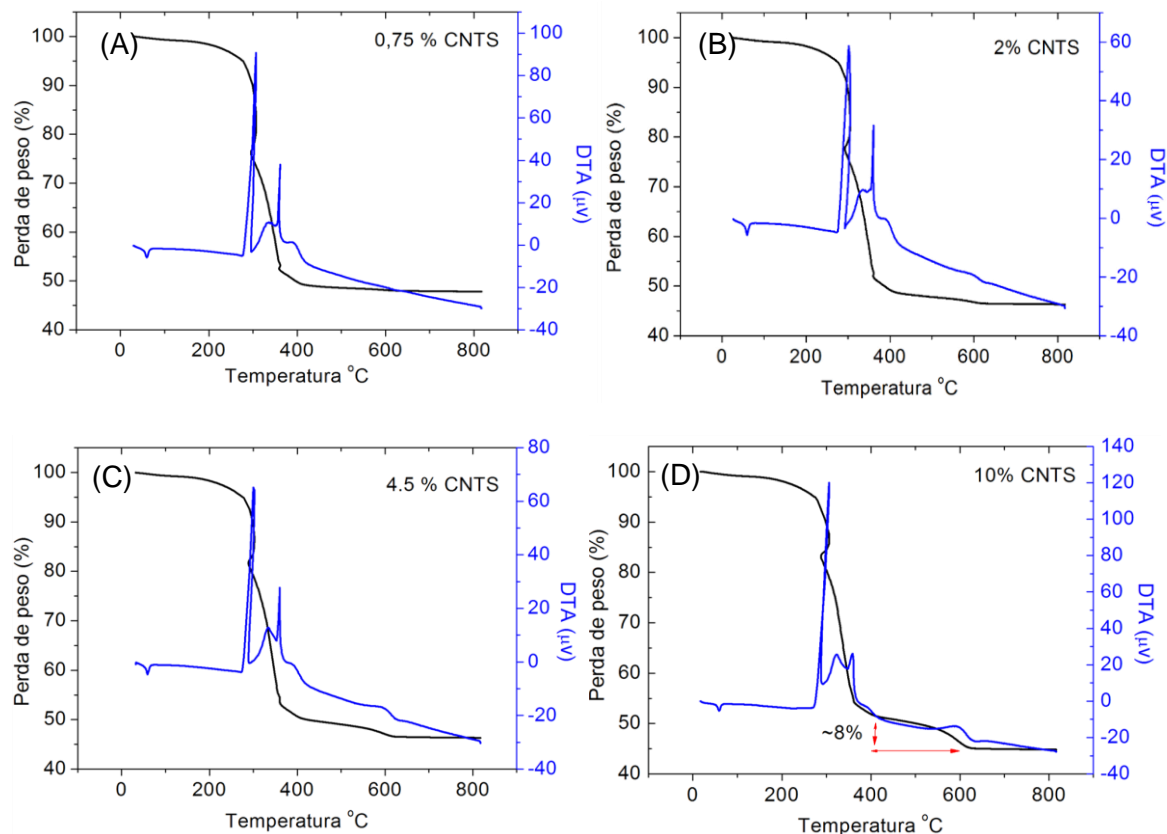


Fig. 44 - Análises termogravimétricas para a temperatura de degradação da PCL e CNTs. (A) 0,75% CNTs (B) 2% CNTs (C) 4,5% CNTs (D) 10% CNTs.

Nas composições com incorporação de CNTs (Fig. 44) verificou-se nos primeiros 400°C o mesmo verificado na análise da degradação da PCL, tanto na curva TG como na de ATD. A partir dos 400°C começou a degradação dos CNTs, no entanto isso foi apenas visível a partir da composição que incorporava 2% dos mesmos. É nitidamente visível na curva (D) a perda de massa relativa à carga dos CNTs, correspondente a uma perda de cerca de 8%, um valor muito próximo da carga inicialmente medida. Quanto à análise de ATD, observou-se um ligeiro pico de reação exotérmica por volta dos 600°C, pertencente à reação de degradação dos CNTs.

3.2. *Propriedades elétricas*

A resistência elétrica é uma grandeza física que expressa a capacidade de um corpo se opor à passagem de corrente elétrica, mesmo quando há a aplicação de uma diferença de potencial. Esta grandeza é dependente das dimensões e do tipo de material pelo qual o corpo é composto.

O scaffold de controlo, ou seja, o que não incorporava CNTs, como era composto por materiais isolantes (HAp/PCL) não apresentou registos de medições elétricas pois o seu valor de resistência era superior ao valor de deteção do equipamento de 1MΩ.

Para os *scaffolds* que incorporavam CNTs já se obtiveram resultados de medições elétricas. Este facto era já previsível pois os CNTs ao serem eletricamente condutores vão conferir condutividade elétrica ao material através da formação de uma rede condutora tridimensional ao longo do scaffold. Esta característica já foi anteriormente comprovada por diversos autores, nomeadamente os já supracitados Supronowicz et al [44] e M. Vila et al [45]. Estes autores, através da incorporação de CNTs em estruturas compósitas com materiais isolantes, como o ácido poliláctico (PLA) e sílica em estruturas mesoporosas ordenadas, também obtiveram um resultado final de materiais compósitos com propriedades condutoras.

Para as quatro composições que incorporaram CNTs obtiveram-se os gráficos de tensão/corrente abaixo ilustrados na Fig. 45.

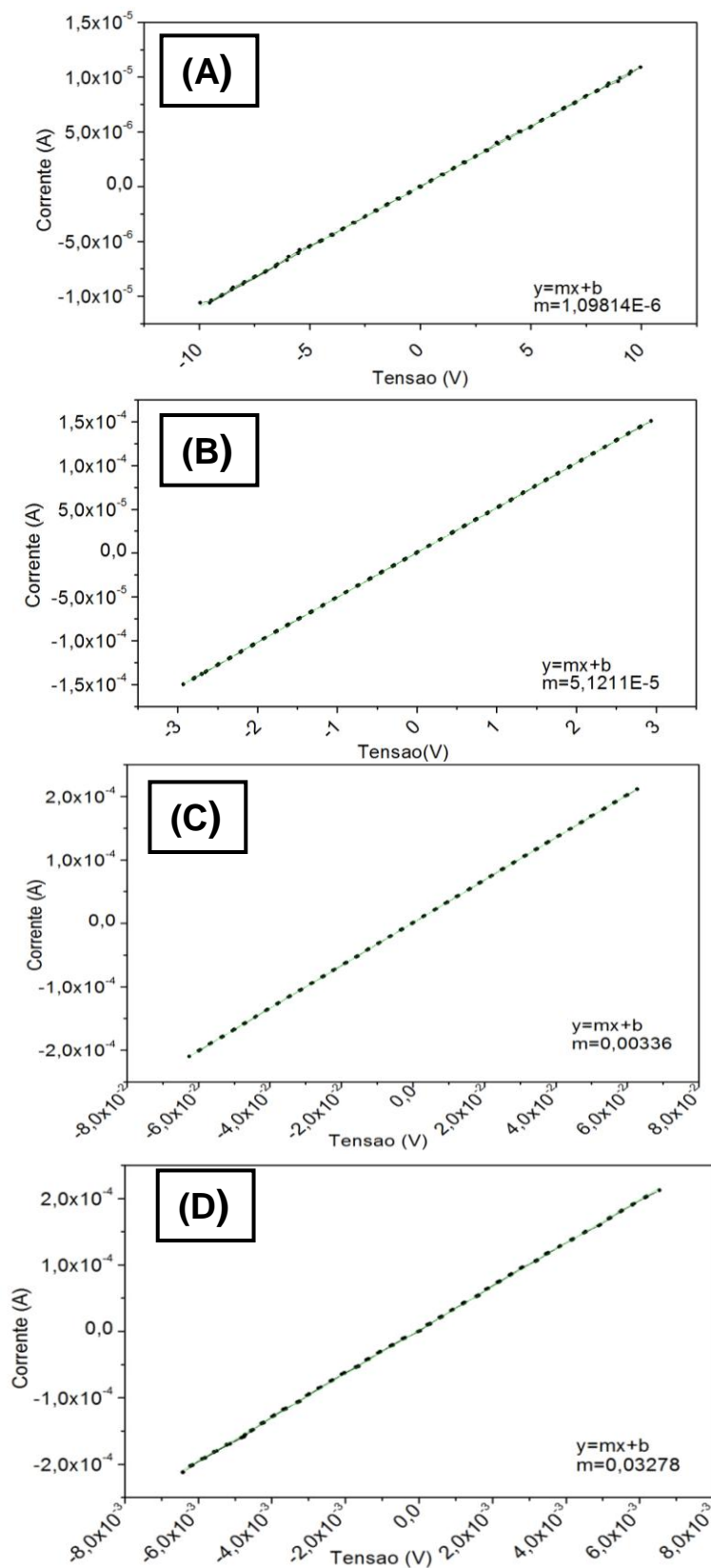


Fig. 45 - Gráficos tensão/corrente para as amostras **(A)** 0,75% CNTs, **(B)** 2% CNTs, **(C)** 4,5% CNTs e **(D)** 10% CNTs.

Segundo a análise dos gráficos obtidos, podemos verificar que todos os compósitos que incorporam CNTs na sua composição apresentaram um comportamento ôhmico, ou seja, gráficos com uma tendência linear (Fig. 45) em que a corrente elétrica no interior varia linearmente com a tensão aplicada, sendo a resistência a constante de proporcionalidade entre estas duas grandezas. Assim, para obter os valores de resistência do material, desenhou-se uma linha de tendência linear para proceder ao cálculo da resistência, sendo esta dada pelo inverso dos declives das retas correspondentes.

Os valores obtidos encontram-se na Tabela 11:

Tabela 11 – Valores de resistência obtidos para cada tipo de composição.

Composição	Resistência (Ω)	Erro
0,75CNT	910630	1194,47324
2CNT	19527	5,29153
4,5CNT	298	0,043
10CNT	31	0,04645

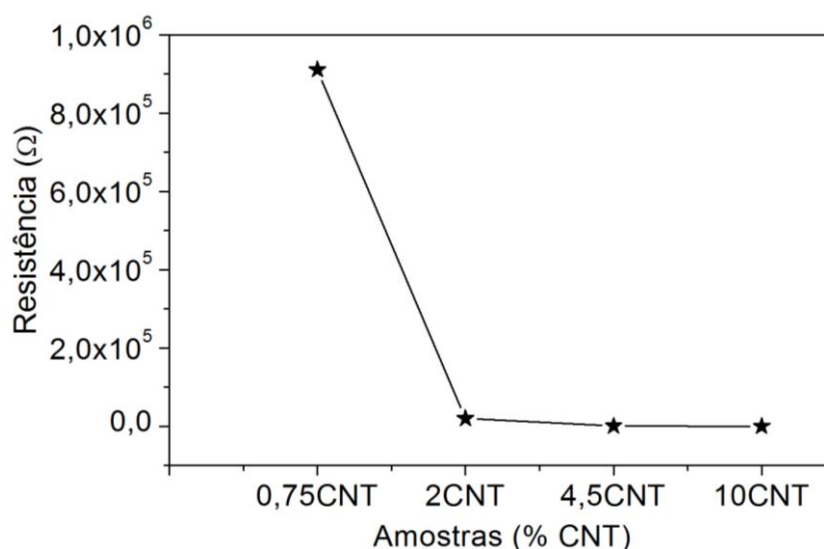


Fig. 46 - Representação gráfica dos valores de resistência obtidos nas medidas elétricas.

Verificou-se que à medida que a concentração de CNTs na matriz das amostras aumenta, a resistência elétrica diminui (Fig. 46), havendo uma drástica diminuição de 3 ordens de grandeza até às amostras com 4,5% CNTs. Entre os 4,5% e os 10% de CNTs

observa-se a diminuição na resistência de uma ordem de grandeza, uma diminuição não tão acentuada como a verificada entre as outras composições.

Com estes valores, pressupõe-se que as amostras produzidas poderão ser utilizadas como materiais condutores utilizados para estimular eletricamente as células ósseas.

3.3. *Propriedades mecânicas*

O presente trabalho teve como um dos objetivos caracterizar mecanicamente os *scaffolds* fabricados através do processo de impressão 3D compostos por 3 fases: polimérica – PCL, cerâmica – HAp e CNTs. A caracterização dos modelos produzidos foi realizada através de ensaios de compressão uniaxial com o objetivo de estudar a aplicação destes *scaffolds* ao tecido ósseo. Esta técnica foi a escolhida pois como referido anteriormente, o osso é uma estrutura que está sujeita predominantemente a esforços de compressão [100].

Para ter um termo de comparação, foram retirados os valores correspondentes a uma deformação de 50% do material, correspondendo estes no gráfico à tensão nominal. Como foram sacrificados 3 espécimes de cada composição, estes representados através da nomenclatura e cores: (—) Amostra 1 (—) Amostra 2 (—) Amostra 3.

Os valores de RC obtidos apresentam-se na Tabela 12:

Tabela 12 – Valores de resistência à compressão para as diferentes amostras de cada composição.

Composição	Resistência à compressão (MPa) para 50% de deformação			Valores médios	Desvio padrão
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3		
0 CNT	42	18	27	29	12,12436
0,75 CNT	12	36	27	25	12,12436
2 CNT	20	9	17	15	5,686241
4,5 CNT	20	14	13	12	3,785939
10 CNT	13	5	6	8	4,358899

As curvas de tensão/deformação encontram-se representados nas Fig. 47 e 48.

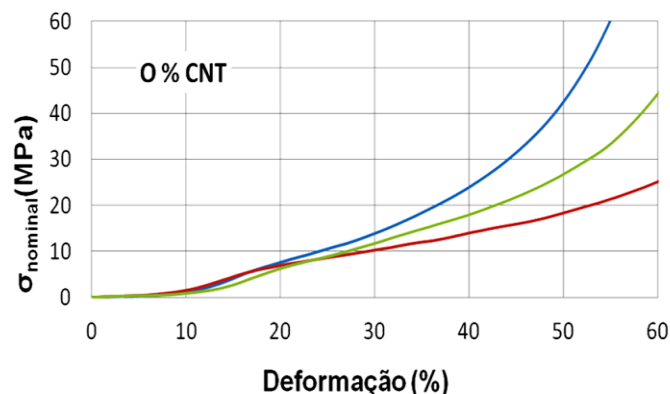


Fig. 47 - Gráfico ilustrativo das curvas de tensão/deformação obtidas para a composição de 0%CNTs.

Analisando o gráfico de tensão deformação para a composição com 0% de CNTs, verificamos que até aos 12% de deformação, o material apresenta um comportamento linear, derivado ao comportamento elástico do material. A partir deste valor a curva tem um crescimento exponencial derivado à deformação plástica e densificação do material. Para avaliar para 50% de deformação os valores obtidos foram de 42, 18 e 27 MPa para os ensaios das amostras 1, 2 e 3, respectivamente.

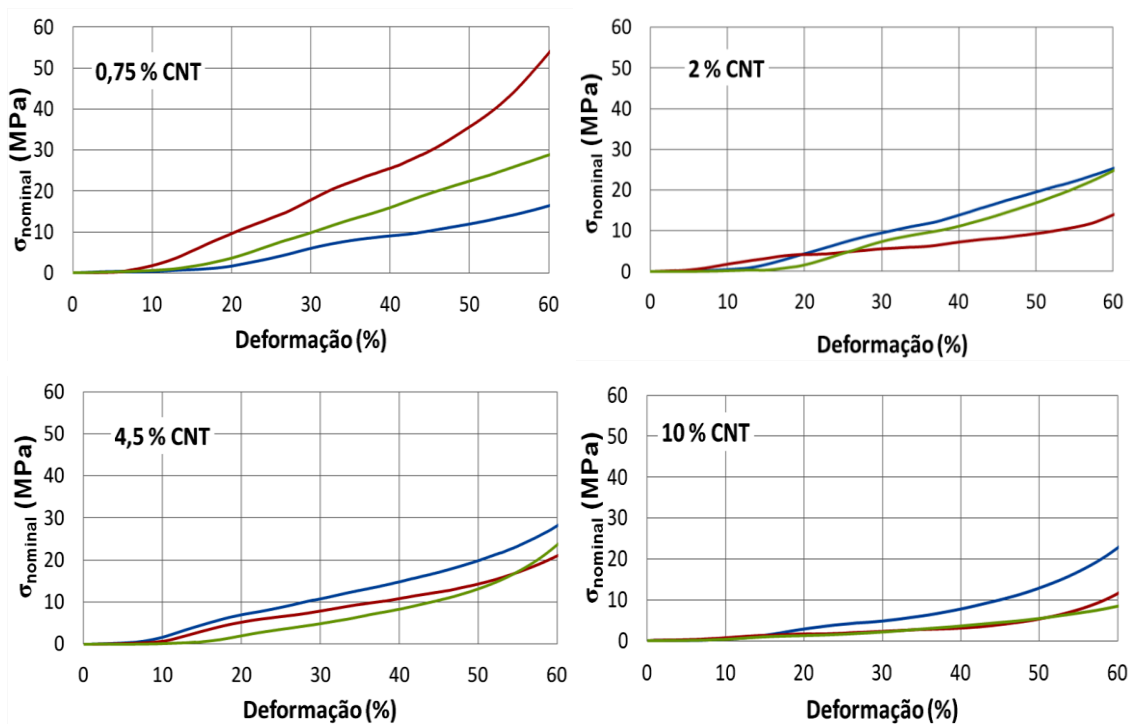


Fig. 48 - Gráfico ilustrativo das curvas de tensão/deformação obtidas para todos os scaffolds com CNTs na sua composição.

O mesmo comportamento é observado para as composições que incorporam CNTs, no entanto os valores de RC para a mesma percentagem de deformação são inferiores aos apresentados pela composição que possui 0% CNTs. As amostras que apresentaram melhor comportamento mecânico ao nível da RC foram as que continham 0,75 e 2% de CNTs.

Apesar de não se verificar uma melhoria das propriedades mecânicas, com a introdução de CNTs na composição das amostras podemos verificar que todos os valores observados estão dentro dos valores de resistência à compressão apresentados na literatura para o osso trabecular situados entre os 2 e os 12 MPa [14].

A análise das propriedades mecânicas pode ser melhorada através da modificação dos modelos e protocolos de medida que podem ser otimizados para amostras elásticas. No entanto, podemos concluir que estes *scaffolds* se podem destinar a aplicações em que o osso envolvido seja o osso trabecular.

4. Caracterização biológica

4.1. Estudos de bioatividade

Como os materiais desenvolvidos se destinam à aplicação em *scaffolds* de regeneração óssea, tornou-se conveniente estudar a sua bioatividade, ou seja, a capacidade para a possível formação de uma camada de apatite que leve à formação de um vínculo do material com o osso. Assim realizaram-se estudos de imersão em que após término destes foram analisados os fluidos de imersão e superfície do material por SEM.

A Fig. 49 apresenta a evolução da concentração dos iões de Ca e P no SBF durante o ensaio de bioatividade. São mostradas as concentrações iónicas no SBF antes da imersão dos *scaffolds* (0 dias) e no SBF residual depois da imersão dos *scaffolds* por diferentes períodos de tempo: 4, 7 e 21 dias.

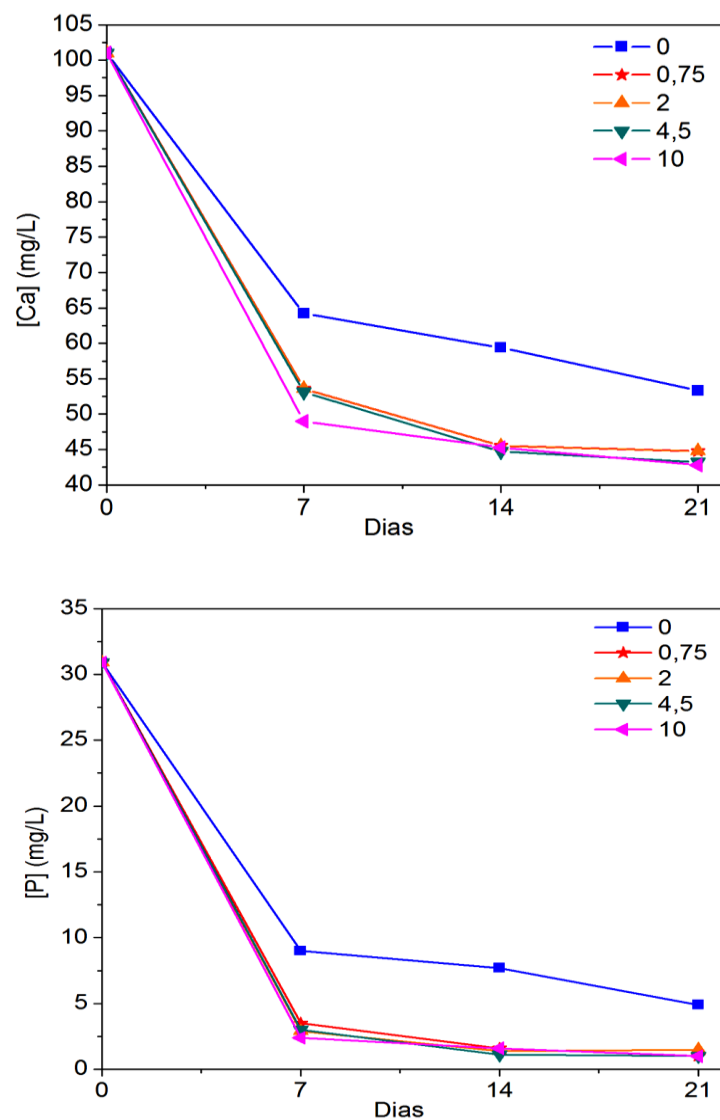


Fig. 49 - Evolução da concentração iónica em Ca e P no SBF durante o ensaio de bioatividade.

Observou-se aos 7 dias de imersão, que em todos os casos houve uma diminuição dos iões de Ca e P quando comparado com o SBF inicial. O mesmo efeito se verificou para os outros dias de imersão, observando-se, no entanto, que a partir do 14º dia de imersão a diminuição se torna menor. Este facto é consistente com o facto de que os iões em solução estejam a contribuir para a formação e crescimento de núcleos de fosfato de cálcio mediante precipitação, que numa fase mais tardia levam ao crescimento de uma camada apatítica.

Verificou-se também que as amostras que não possuem CNTs na sua composição têm um menor decréscimo nas concentrações de Ca e P, concluindo-se que a formação de uma camada apatítica é menos intensa, e por isso, possuem uma bioatividade mais lenta.

Estes dados indicam que os *scaffolds* produzidos possuem uma bioatividade semelhante à da HAp o que pode sugerir que sejam potenciais materiais para a aplicação de implantes para regeneração óssea.

Para avaliar a superfície das amostras e a formação de uma camada de apatite após os ensaios de imersão foram realizadas micrografias de SEM.

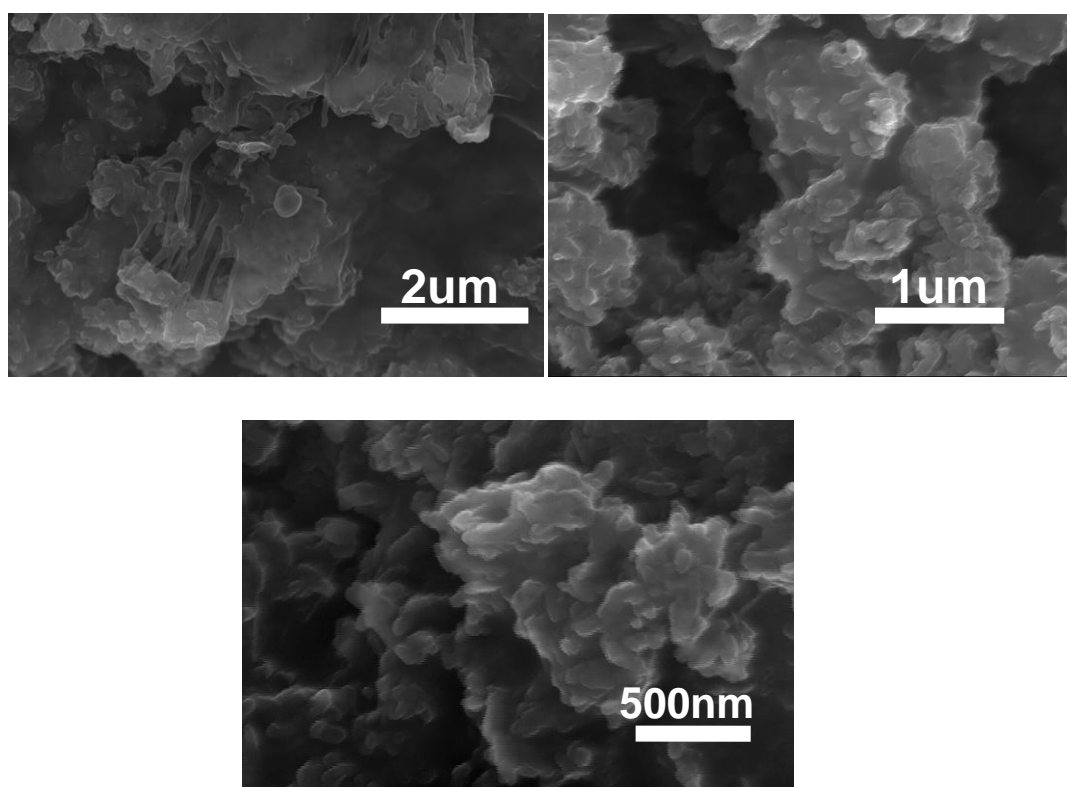


Fig. 50 - Micrografias de SEM obtidas para as amostras de composição 2% de CNTs imersas em SBF por 21 dias.

Na Fig. 50, referente uma amostra de 2% de CNTs após 21 dias de imersão, visualizou-se a ausência de uma camada de apatite apesar de as análises de ICP terem sofrido alterações nas concentrações iónicas de Ca e P. Isto pode ser explicado pelo facto de a HAp possuir uma bioreatividade relativa lenta, como sugerido por Hench [33]. A HAp, identificada na Fig. 51 com a letra E, na classe dos materiais bioativos é a que possui um

menor valor de bioatividade, comparando por exemplo com o material com a letra A, correspondente ao 45S5 Bioglass®.

Com estes dados, pressupõe-se que o tempo de imersão deveria ser maior para assim se poder começar a visualizar a formação da camada de apatite à superfície do material.

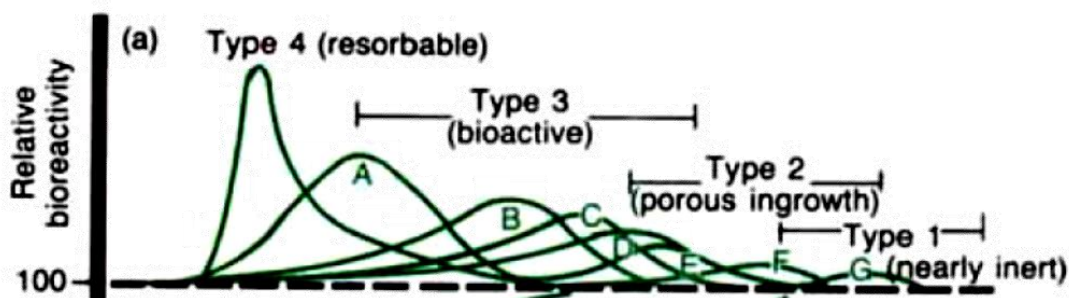


Fig. 51 - Espectro de bioatividade de vários implantes biocerâmico relativamente à taxa relativa de bioactividade (a). (A) 45S5 Bioglass® (B) KGS Ceravital® (C) 55S4.3 Bioglass® (D) A/W vidro-cerâmico (E) HA (F) KGX Ceravital ® e (G) $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-Si}_3\text{N}_4$. Adaptado de [33].

4.2. Estudos preliminares de adesão celular

Antes de considerar qualquer tipo de material para ser aplicado à biomedicina é necessário realizar análises de citotoxicidade e biocompatibilidade.

Foram realizadas análises preliminares de citocompatibilidade através da avaliação de culturas *in vitro* com osteoblastos provenientes de osteosarcoma. Estes foram semeados sobre a superfície dos *scaffolds* e cultivados durante 6 dias. Foram efetuadas análises de SEM na superfície de todas as estruturas para a avaliação da extensão celular e a sua modificação com o tempo de cultura. As observações foram feitas a duas ampliações e foram identificadas as regiões onde existiam CNTs. As imagens obtidas são as seguintes:

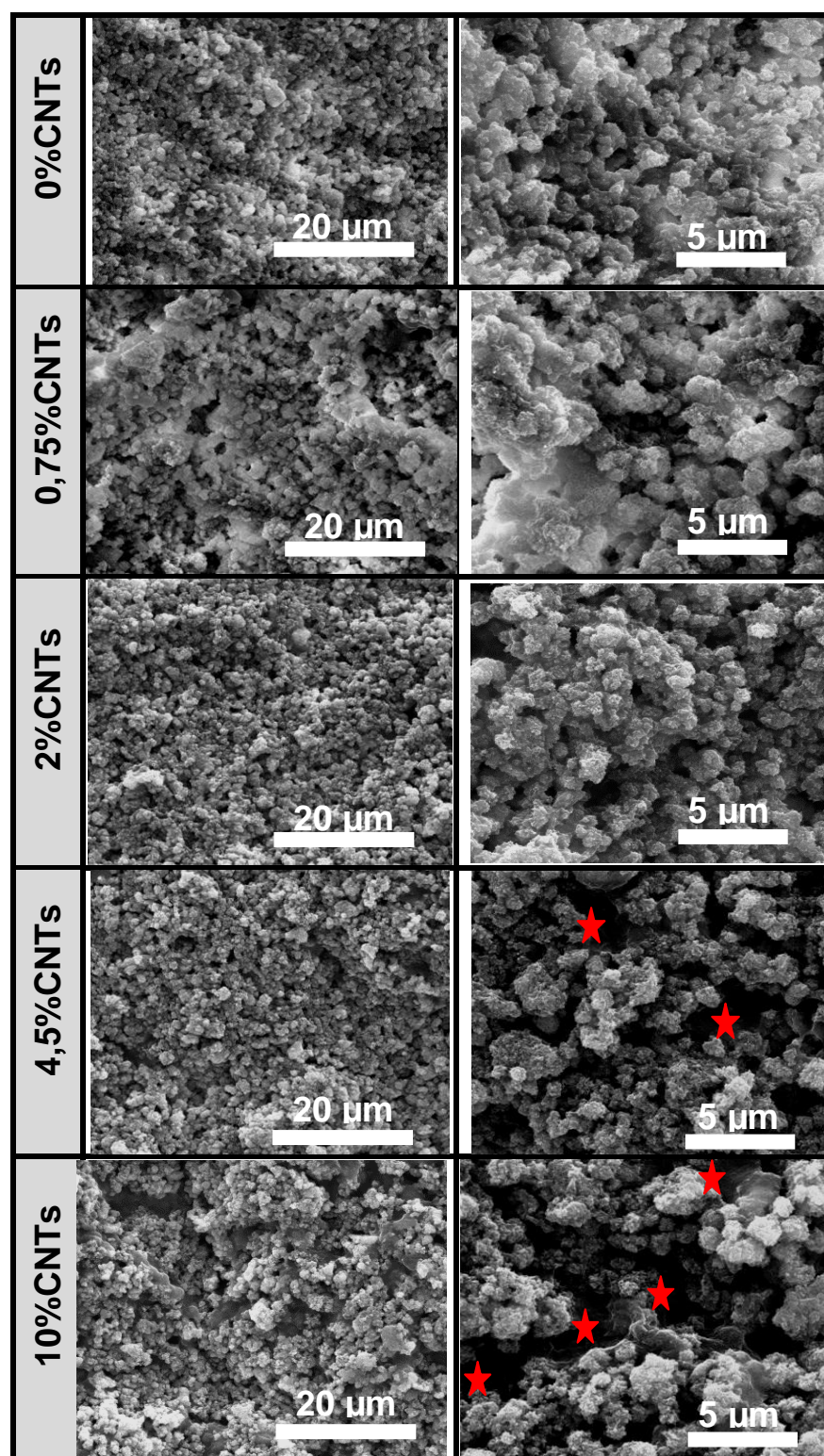


Fig. 52 - Imagens de SEM das amostras antes dos ensaios biológicos. ★ - Áreas com CNTs.

As imagens obtidas (Fig. 52) apresentam uma estrutura semelhante ao já anteriormente observado em imagens de regiões de fratura dos compósitos nas imagens de SEM (Fig. 27). Visualizam-se aglomerados de material inorgânico, coesos através do material polimérico.

Relativamente aos estudos de adesão celular dos osteoblastos, as imagens relativas a todos os compósitos estão abaixo apresentadas (Fig. 53 a 57), onde estão representados os resultados obtidos para 1,3 e 6 dias de cultura.

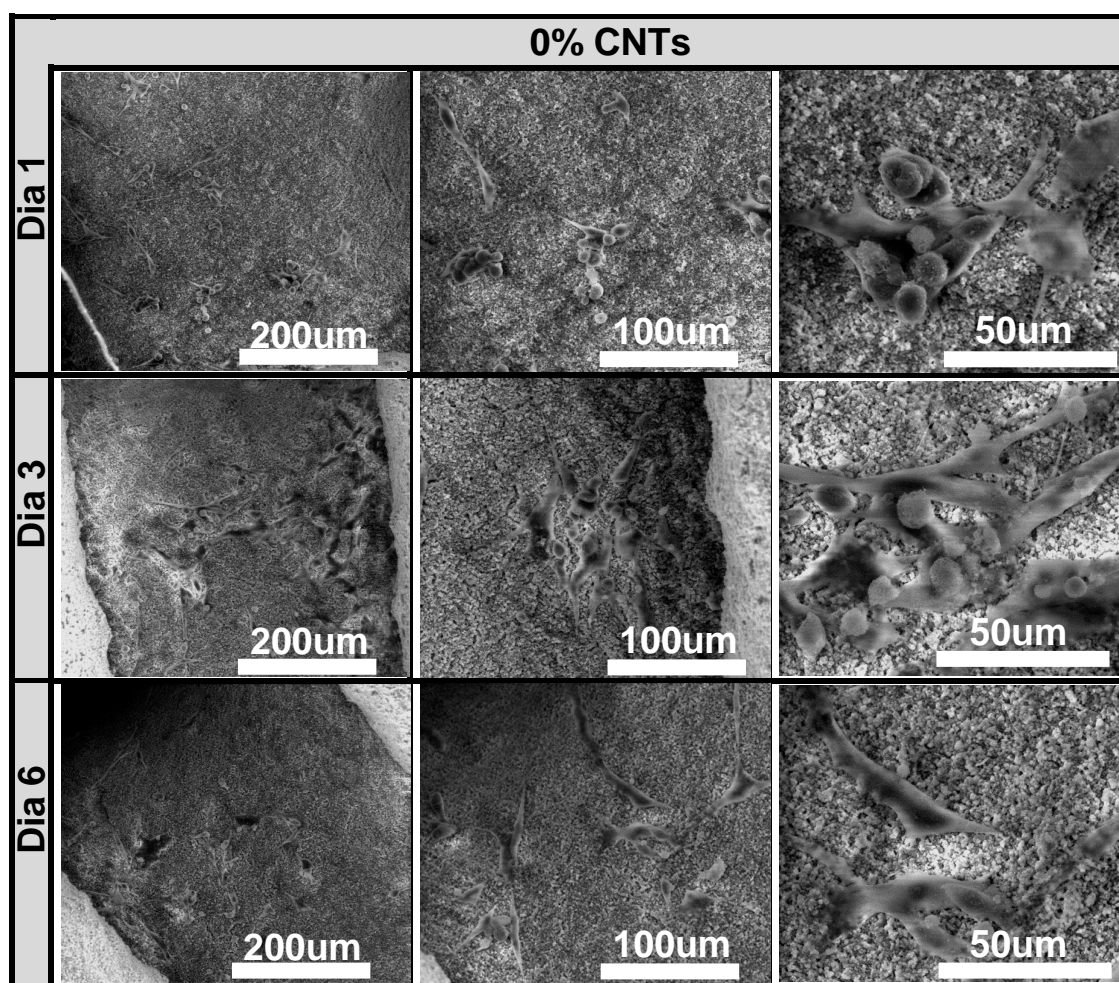


Fig. 53 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos *scaffolds* de 0% de CNTs.

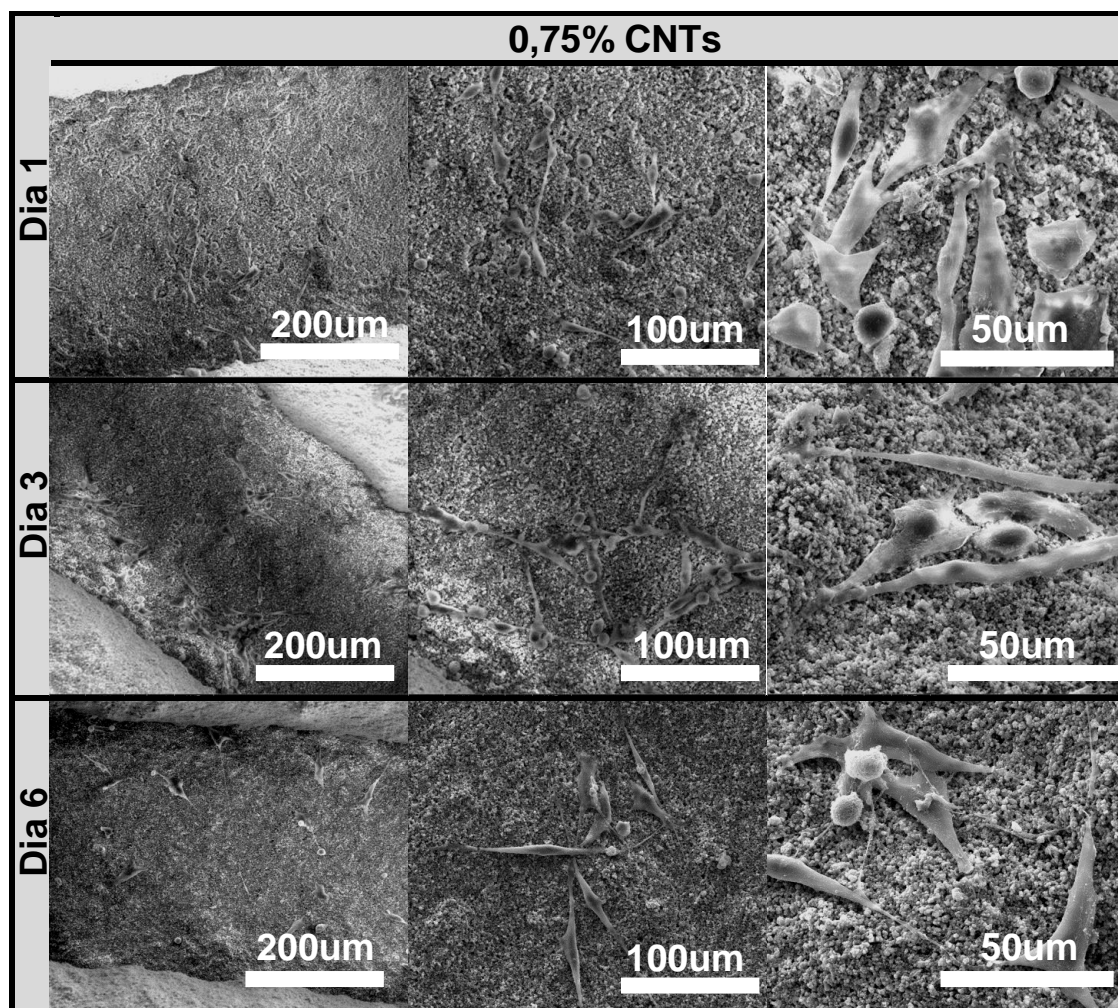


Fig. 54 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos *scaffolds* de 0,75% de CNTs.

No compósito que contém 0% e 0,75% de CNTs, os resultados obtidos são muito semelhantes, observando-se que ao fim do primeiro dia há a adesão de algumas células à superfície do material. Algumas das células observadas apresentam uma morfologia alongada, no entanto também se observam células de forma arredondada que correspondem, muito provavelmente, a células mortas ou não aderidas ao material devido ao reduzido tempo de cultura. Ao terceiro dia as imagens sugerem um ligeiro aumento no número de células aderidas, visualizando-se também, a presença de células de morfologia alterada, resultantes da técnica agressiva de preparação. Ao final do sexto dia observa-se uma diminuição no número das células.

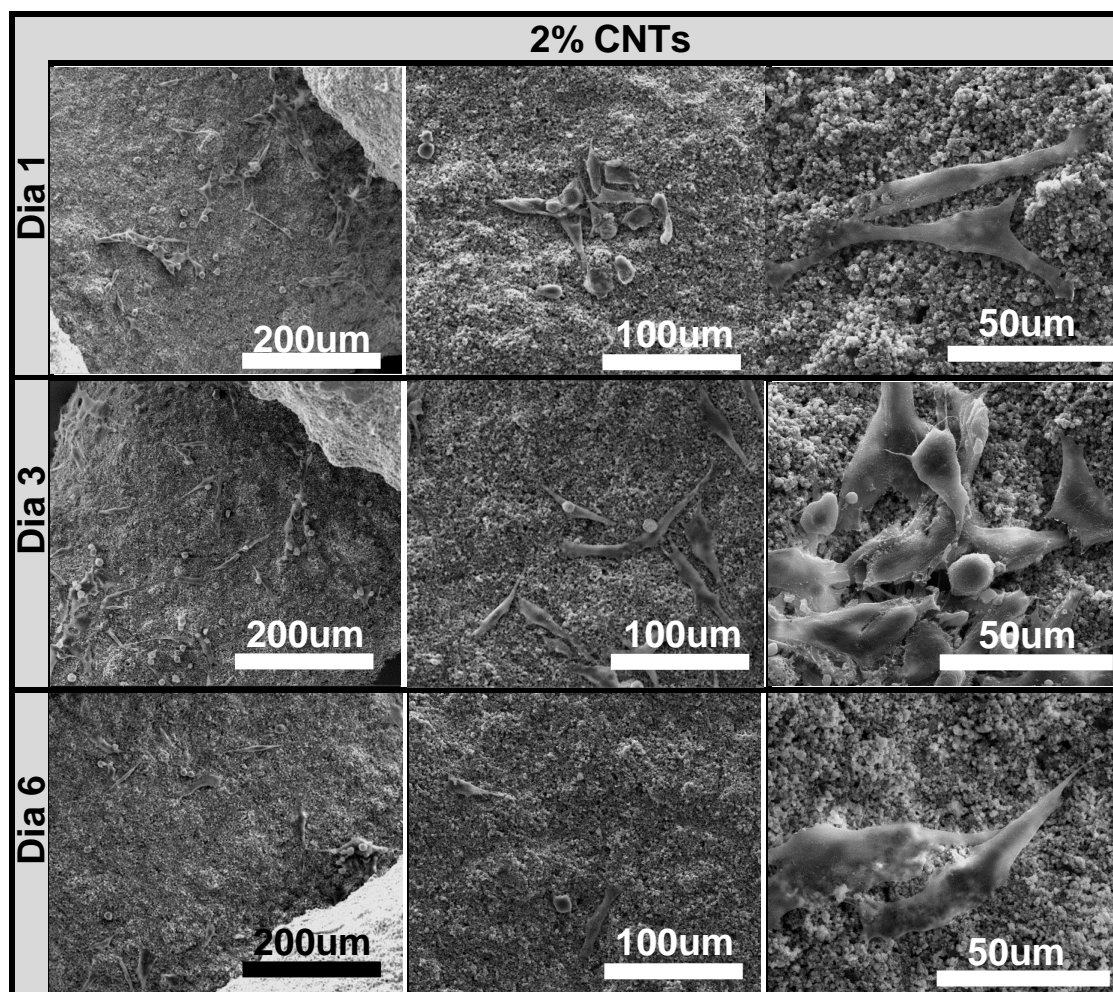


Fig. 55 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos *scaffolds* de 2% de CNTs.

Comparando os *scaffolds* que contém 2% de CNTs com os de 0 e 0,75%, as imagens sugerem que há um maior aumento do número de células aderidos à superfície logo ao primeiro dia. O número de células aumenta ligeiramente ao terceiro dia, diminuindo no entanto, ao final do sexto dia de cultura. A maioria das células observadas apresenta uma morfologia alongada, mas visualizam-se também células de morfologia arredondada sugerindo a presença de células mortas ou não aderidas ao material.

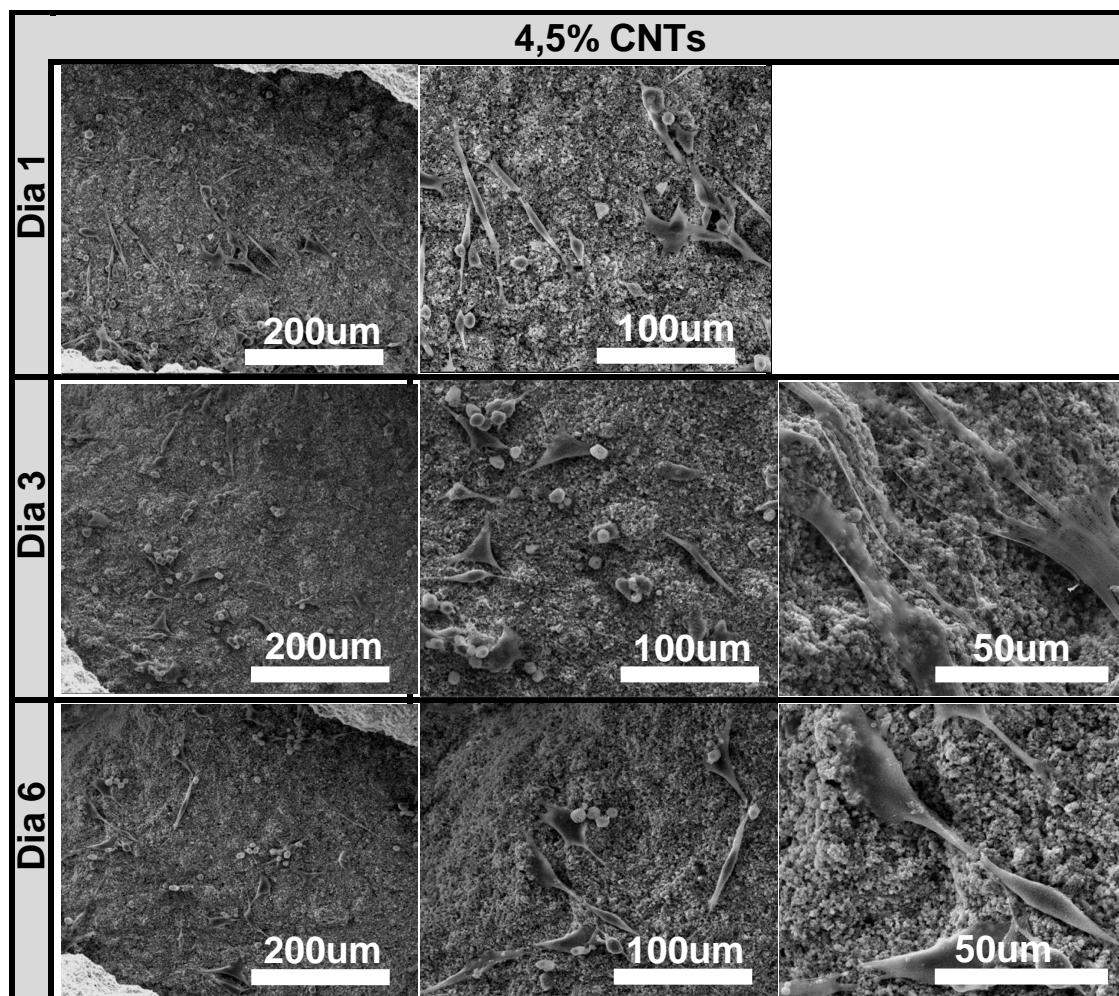


Fig. 56 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos *scaffolds* de 4,5% de CNTs.

Os *scaffolds* com uma formulação de 4,5% quando comparados com os *scaffolds* de 2% de CNTs apresentam um pequeno aumento do número de células aderidas à superfície ao primeiro dia, número este, que sugere aumentar igualmente do terceiro para o sexto dia de cultura quando se visualizam as imagens de menores ampliações. Paralelamente às outras observações, as células observadas são na sua maioria de morfologia alongada aparecendo também células de morfologia alterada e redonda sugerindo a presença de células mortas ou não aderidas.

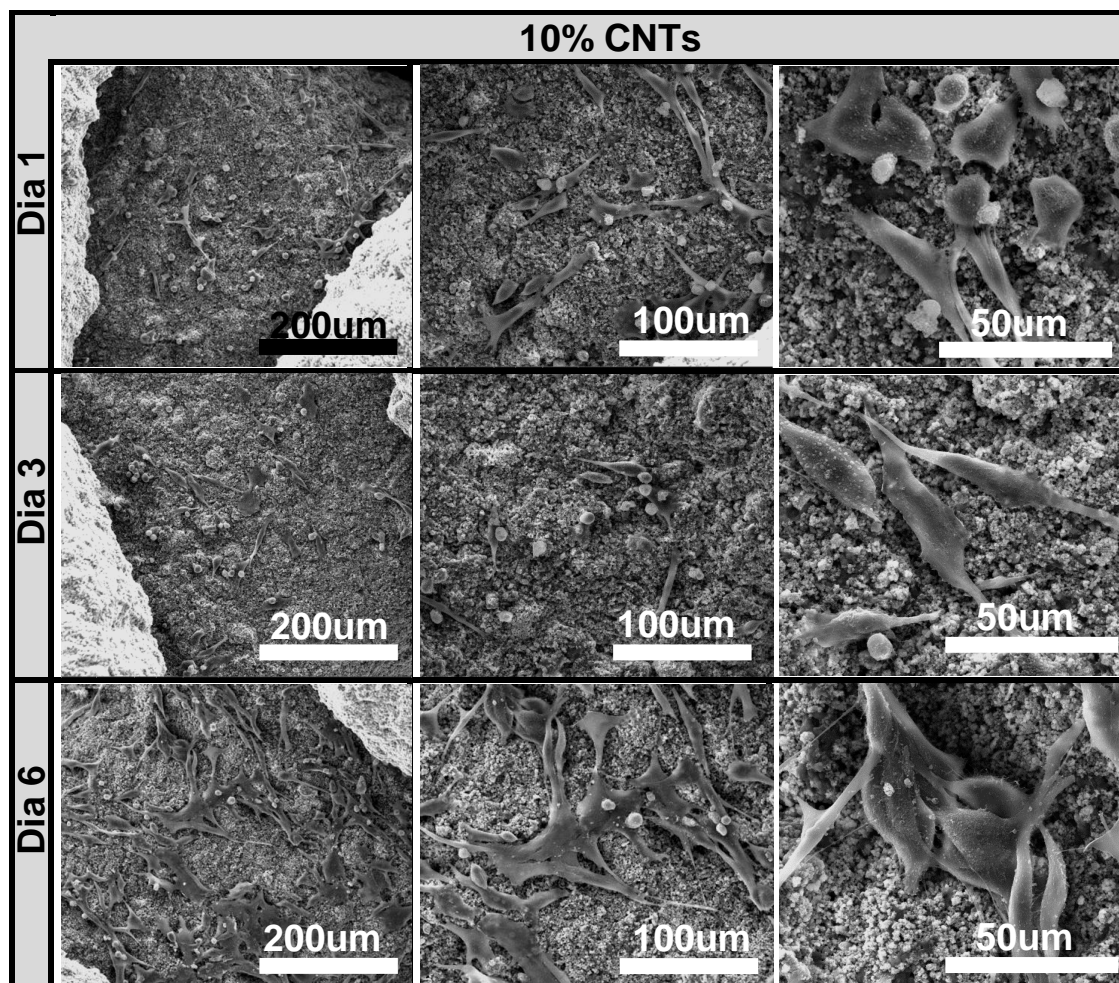


Fig. 57 - Imagens de SEM relativas às culturas celulares nos *scaffolds* de 10% de CNTs.

Analisando as amostras que contém 10% de CNTs verifica-se que estas possuem o melhor comportamento biológico. O número de células aderidas à superfície do material é evidentemente maior durante todos os períodos de cultura, inclusive até ao sexto dia onde já se pode também visualizar ao fim do período de cultura o material coberto com uma camada celular. A maioria das células apresenta uma morfologia alongada, possuindo prolongamentos citoplasmáticos e conexão intercelular, como se pode visualizar na imagem de maior ampliação.

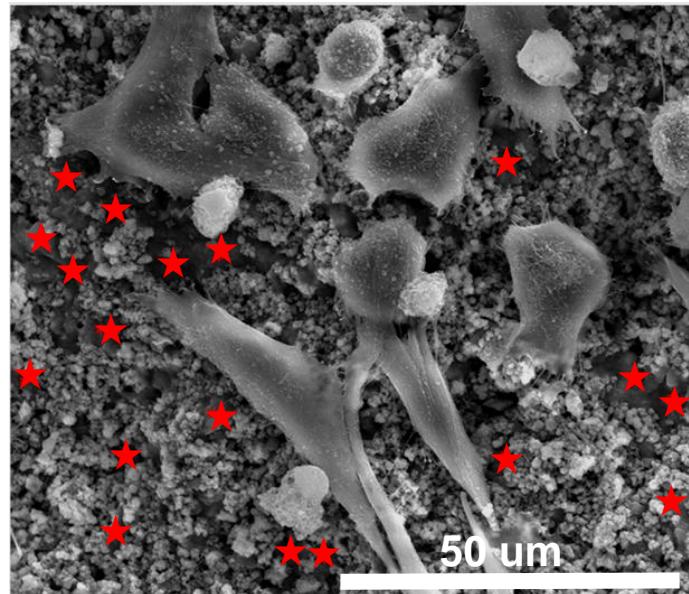


Fig. 58 - Imagem de maior ampliação do scaffold com 10% de CNTs ao dia 1 de cultura. ★ - Regiões que contêm CNTs.

Fazendo uma análise global dos resultados obtidos e de acordo com as análises de SEM efetuadas, há indícios de biocompatibilidade em todas as amostras, pois verificou-se a adesão celular em todas elas. Nas composições com composições de 0 e 2% CNT, o número de células diminuiu do terceiro para o sexto dia de cultura e nas amostras com 4,5% CNT, o número de células foi sensivelmente semelhante nos dias 3 e 6. A diminuição do número de células aderidas à superfície das amostras com o aumento dos dias de cultura é muitas vezes e originado pela falta de confluência celular, ou seja, de conexão intercelular. Este efeito é muito característico em culturas de células em *scaffolds* 3D e pode ser ultrapassado semeando um maior número de células, havendo assim proximidade suficientemente entre elas para poderem propagar os *filopodia*. Relativamente a este estudo em concreto é necessário semear um maior número de células pois a área de superfície específica dos *scaffolds*, por serem macroporosos, é maior do que em superfícies lisas. [109]

As amostras que contêm 10% CNT são claramente melhores relativamente à resposta biológica pois verificou-se que além de haver um maior número de células observadas logo no primeiro dia de cultura, as células proliferaram ao longo dos 6 dias. No final do

sexto dia visualizou-se que existem mesmo zonas da superfície do material cobertas com camada celular.

Estes dados revelam que quanto maior a quantidade de CNTs incorporados melhor é a adesão celular.

Como anteriormente demonstrado, a adesão celular e a adsorção de proteínas são afetadas quando há a presença de superfícies carregadas quer negativa ou positivamente, tendo estas uma influência direta na atividade metabólica das células. No caso das superfícies com CNTs, tem sido investigado, em outros casos, o seu efeito sobre a polarização dos compósitos, tendo sido demonstrado que estes aumentam a carga da superfície através da modificação do potencial ζ (zeta). [45,110,111] Este acontecimento implicaria uma maior adsorção de proteínas à superfície das amostras com CNT, como consequência de uma maior carga superfície combinada com uma maior hidrofobicidade, prevista devido à natureza dos materiais com CNTs. A adsorção de proteínas é promovida pelas forças de interação hidrofóbica, ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, devendo então a adsorção das proteínas ser maior com a combinação das superfícies mais hidrofóbicas (do que nas hidrofílicas) com a interação eletrostática. [109]

A adsorção proteica foi comprovada, também, em trabalhos anteriores, tendo sido demonstrado que a carga de superfície positiva e negativa podem influenciar positivamente a adsorção de proteínas sobre superfícies de materiais. O resultado obtido foi muito interessante, pois o aumento da atividade dos osteoblastos denota que o metabolismo das células ósseas é estimulado pela presença de CNTs em todos os compósitos. [45]

Conclusões

Foram preparados *scaffolds* compósitos de PCL com HAp e de PCL com HAp e diferentes proporções de CNTs através da técnica de prototipagem rápida por impressão direta. Nas composições com incorporação de CNTs utilizaram-se as percentagens de peso de 0,75; 2; 4,5 e 10% de modo a investigar qual a influência da sua carga nos compósitos.

Os *scaffolds* obtidos caracterizaram-se por possuírem uma estrutura aproximadamente cilíndrica com poros de forma quadrada, e por avaliação visual por SEM observam-se tamanhos de poro entre os 450 e os 700 μm , interconectados em todas as suas dimensões. As medidas de porosidade no intervalo macro-micrométrico de 1-300 μm mostram uma % de porosidade total de aproximadamente 57 e 43% para as amostras sem e com CNTs, respetivamente. No intervalo de mesoporosidade observa-se uma superfície específica de 6.44 m^2/g para o caso dos CNTS sendo esta superfície quase depreciável para o scaffold de HA/PCL.

A introdução de HAp nos *scaffolds* permitiu obter compósitos capazes de induzir, em SBF a precipitação duma camada apatítica, sugerindo que estes possuem um carácter bioativo.

A presença de CNTs na sua estrutura influenciou o comportamento elétrico das amostras, transformando os compósitos isolantes elétricos de PCL e HAp em estruturas condutoras, devido a rede condutora tridimensional formada por os CNTs. Este facto provocou a diminuição da resistência em várias ordens de magnitude.

Sobre as propriedades mecânicas, a presença de CNTs não mostrou ter influência na melhoria das propriedades mecânicas, no entanto os valores obtidos encontram-se compatíveis para a aplicação dos compósitos no osso trabecular. Este facto pode dever-se à natureza elástica dos compósitos que precisam de uma modificação dos protocolos dos ensaios de compressão.

Podemos também concluir, que apesar de não ter havido melhoria nas propriedades mecânicas, a introdução de CNTs é benéfica na medida em que pode permitir estudos de estimulação elétrica em processos de regeneração tecidual.

Conclui-se, por fim, que os *scaffolds* produzidos são biocompatíveis, sendo que o compósito com melhor resposta biológica o que incorpora 10% CNTs.

Como consideração final estima-se que os compósitos produzidos podem ser promissores no campo da medicina regenerativa óssea pois compilam qualidades de biodegradabilidade, bioatividade, biocompatibilidade, resistências mecânicas à compressão adequadas ao osso trabecular e ainda a capacidade de condução elétrica para aplicações em tratamentos eletricamente estimulados.

Propostas de trabalho futuras

Nos *scaffolds* de PCL, HAp e CNTs preparados neste trabalho, existem várias características que podem ser otimizadas e outras que necessitam ser investigadas.

- Para melhor investigar as propriedades bioativas do material poderão ser feitos estudos de imersão mais prolongados contemplando prazos acima dos 30 dias.
- Para melhorar as propriedades mecânicas, poder-se-á recorrer a uma melhor técnica de dispersão das fases inorgânicas para verificar se existem melhorias nos seus valores. Poderá também ser investigada uma nova morfologia para os corpos produzidos, nomeadamente ao nível do corpo e do poro e analisar se existe alguma diferença nos valores de propriedades mecânicas. Este aspecto é importante pois em termos aplicacionais visa-se obter corpos anatomicamente adaptados a cada situação.
- Estudar melhor a formulação que possui 10% de CNTs pois foi a que apresentou melhor resposta biológica.
- Realizar estudos de estimulação elétrica em culturas celulares, uma vez que, por falta de tempo e recursos não foram realizados.
- Realizar novos estudos celulares incluindo também estudos em regime dinâmico, semeando um maior número de células.

- Para possuir a uma melhor aproximação do comportamento dos *scaffolds* ao corpo humano, poderão ser conduzidos estudos *in vivo* em animais.

Bibliografia

- [1] Junqueira L, Carneiro J. Histologia básica - texto e atlas. Guanabara Koogan S.A., 2004.
- [2] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clinical Journal of the American Society of Nephrology 2008;3:131-9.
- [3] Gonçalves C, Bairos V. Histologia texto e imagem. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2010.
- [4] Tortora G, Derrickson B. Principles of anatomy and physiology. John Wiley & Sons, Inc, 2009.
- [5] Salgado A, Coutinho O, Reis R. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. Macromolecular Bioscience 2004;4:743-65.
- [6] Alobeedallah H, Ellis J, Rohanizadeh R, Coster H, Dehghani F. Preparation of nanostructured hydroxyapatite in organic solvents for clinical applications. Trends Biomaterials Artificial Organs 2011;25:12-19.
- [7] Gil I, Gracia M, Pingarrón M, Jerez L. Physiological bases of bone regeneration i. histology and physiology of bone tissue. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal 2006;11:47-51.
- [8] Completo A, Fonseca F. Fundamentos de biomecânica músculo-esquelética e ortopédica 2011.
- [9] Hill P. Bone remodelling. British Journal of Orthodontics 1998;25:101-107.

- [10] Gil I, Gracia M, Pingarrón M, Jerez L. Physiological bases of bone regeneration ii. the remodeling process. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 2006;11(2):151-7.
- [11] Lieberman J, Friedlaender G. Bone regeneration and repair. Totowa, NJ: Humana Press, 2005.
- [12] Doblaré M, García JM, Gómez MJ. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics* 2004;71(13-14):1809-1840.
- [13] Morgan E, Bouxsein M. Biomechanics of bone and age-related fractures. In: *Principles of bone biology*. Academic Press, 2008.
- [14] White A, Best S, Kinloch I. Hydroxyapatite/carbon nanotube composites for biomedical applications: a review. *International Journal of Applied Ceramic Technology* 2007;4:1-13.
- [15] Navarro M, Planell J. Bioactive composites based on calcium phosphates for bone regeneration.pdf. *Key Engineering Materials* 2010;44:203- 233.
- [16] Cooper G, Mooney M, Gosain A, Phil G, Losee J, Huard J. Testing the “critical-size” in calvarian bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (csd). *Plast Reconstr Surg* 2011;125:1685-1692.
- [17] Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 2005;74:782-8.
- [18] Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell J. Biomaterials in orthopaedics. *Journal of The Royal Society of Interface* 2008;5:1137-1158.
- [19] Vallet-Regí M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. *Comptes Rendus Chimie* 2010;13(1-2):174-185.
- [20] Ratner B, Et A. *An introduction to materials in medicine*. Elsevier Academic Press, 2004.

- [21] Hench L. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002;295:1014-1017.
- [22] Butscher A, Böhner M, Hofmann S, Gauckler L, Müller R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. *Acta Biomaterialia* 2011;7:907-20.
- [23] Hutmacher D. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* 2001;12:107-24.
- [24] Leong K, Cheah C, Chua C. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* 2003;24:2363-2378.
- [25] Dubok V. Bioceramics: yesterday, today, tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics* 2001;39:381-394.
- [26] Sanchez M, Glindon E, Gil M, Guirado J, Sanchez C. Biomaterials for bone regeneration. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* 2010;15:517-522.
- [27] Nascimento C, Issa J, Oliveira R, Iyomasa M, Siéssere M, Regalo S. Biomaterials applied to the bone healing process. *International Journal of Morphology* 2007;25:839-846.
- [28] Brydone A, Meek D, MacLaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 2010;224:1329-1343.
- [29] Shor L, Darling A, Starly B, Sun W, Güçeri S. Precision extruding deposition of composite polycaprolactone / hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005:5-6.
- [30] Sinha V, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 2004;278:1-23.

- [31] Yoon C, Ji D. Effects of in vitro degradation on the weight loss and tensile properties of pla/lpcl/hpcl blend fibers. *Fibers and Polymers* 2005;6:13-18.
- [32] Sarac A. The ratio of crystallinity and thermodynamical interactions of polycaprolactone with some aliphatic esters and aromatic solvents by inverse gas chromatography. *Polymer Bulletin* 2005;53:349-557.
- [33] Hench L. Bioceramics- from concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 1991;74(7):1487-1510.
- [34] Böhner M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal* 2001;10:114-122.
- [35] Zhu X, Eibl O, Berthold C. Structural characterization of nanocrystalline hydroxyapatite and adhesion of pre-osteoblast cells. *Nanotechnology* 2006;17:2711-2721.
- [36] Heo S, Kim S, Wei J, Hyun Y, Yun H, Kim D, Shin J. Fabrication and characterization of novel nano- and micro-ha / pcl composite scaffolds using a modified rapid prototyping process. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008.
- [37] Bianco A, Cacciotti I, Lombardi M, Montanaro L. Si-substituted hydroxyapatite nanopowders- synthesis , thermal stability and sinterability. *Materials Research Bulletin* 2009;44:345-354.
- [38] Patel N, Best S, Bonfield W. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002;13:1199-1206.
- [39] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991;354:56-59.
- [40] Cheung W, Pontoriero F, Taratula O, Chen A, He H. Dna and carbon nanotubes as medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010;62:633-49.
- [41] Vila M, Manzano M, Vallet-Regi M. Carbon nanotubes: a solution for processing smart biomaterials. *Key Engineering Materials* 2010;441:3-29.

- [42] Zhang F, Weidmann A, Nebe JB, Burkel E. Osteoblast cell response to surface-modified carbon nanotubes. *Materials Science & Engineering C* 2012;32:1057-1061.
- [43] Lobo A, Antunes E, Machado A, Pacheco-Soares C. Cell viability and adhesion on as grown multi-wall carbon nanotube films. *Materials Science and Engineering C* 2008;28:264-269.
- [44] Supronowicz P, Ajayan P, Ullmann K, Arulanandam B, Metzger D, Bizios R. Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation. *Journal of Experimental Medicine* 2002;59:499-504.
- [45] Vila M, Cicuéndez M, Sánchez-Marcos J, Fal-Miyar V, Manzano M, Prieto C, Vallet-Regi M. Electrical stimuli to increase cell proliferation on carbon nanotubes/mesoporous silica composites for drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 2012:1-9.
- [46] Mir M, Hosseini A, Majzoobi G. A numerical study of vibrational properties of single-walled carbon nanotubes. *Computational Materials Science* 2008;43:540-548.
- [47] Meng S, Rouabhia M, Zhang Z, De D, De F, Laval U. Electrical stimulation in tissue regeneration 2005.
- [48] Chłopek J, Czajkowska B, Szaraniec B, Frackowiak E, Szostak K, Béguin F. In vitro studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon* 2006;44(6):1106-1111.
- [49] Smart S, Cassady A, Lu G, Martin D. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* 2006;44:1034-1047.
- [50] Donaldson K, Aitken R, Tran L, Stone V, Duffin R, Forrest G, Alexander A. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology* 2006;92:5-22.
- [51] Ostiguy C, Soucy B, Lapointe G, Woods C, Ménard L, Trottier M. Health effects of nanoparticles. Montréal: IRSST, 2008.

- [52] Kolosnjaj J, Szwarc H, Moussa F. Toxicity studies of carbon nanotubes. In: *Advances in experimental medicine and biology*, vol. 620. 2007. p. 181-204.
- [53] Fraczek A, Menaszek E, Paluszkiewicz C, Blazewicz M. Comparative in vivo biocompatibility study of single- and multi-wall carbon nanotubes. *Acta Biomaterialia* 2008;4:1593-602.
- [54] Lam C, James J, McCluskey R, Hunter R. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology* 2004;77:126-34.
- [55] Lam C, James J, McCluskey R, Arepalli S, Hunter R. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Critical Reviews in Toxicology* 2006;36:189-217.
- [56] Zanello L, Zhao B, Hu H, Haddon R. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Letters* 2006;6:562-7.
- [57] Tran P, Zhang L, Webster T. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009;61:1097-114.
- [58] Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura I, Nakamura K, Ishigaki N, Yamazaki H, Horiuchi H, Kato H, Taruta S, Kim YA, Endo M, Saito N. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 2008;4:240-6.
- [59] Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand J, Prato M, Kostarelos K, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes for plasmid dna gene delivery. *Angewandte Chemie International Edition* 2004;43:5242-5246.
- [60] Besteman K, Lee J, Wiertz F, Heering H, Dekker C. Enzyme-coated carbon nanotubes as single-molecule biosensors. *Nano Letters* 2003;3:727-730.
- [61] Hu H, Ni Y, Montana V, Haddon R, Parpura V. Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth. *Nano Letters* 2004;4:507-511.

- [62] Mattson M, Haddon R, Rao A. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *Journal of Molecular Neuroscience*: MN 2000;14:175-82.
- [63] Mikael P, Nukavarapu S. Functionalized carbon nanotube composite scaffolds for bone tissue engineering: prospects and progress. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* 2011;1:76-85.
- [64] Webster T, Waid M, McKenzie J, Price R, Ejiofor J. Nano-biotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants. *Nanotechnology* 2004;15:48-54.
- [65] Mano J, Sousa R, Boesel L, Neves N, Reis R. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Composites Science and Technology* 2004;64:789-817.
- [66] Rezwan K, Chen Q, Blaker J, Boccaccini A. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3413-31.
- [67] Kalita S, Bose S, Hosick H, Bandyopadhyay A. Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. *Materials Science and Engineering: C* 2003;23:611-620.
- [68] Wei G, Ma P. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25:4749-57.
- [69] Taboas J, Maddox R, Krebsbach P, Hollister S. Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3d polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials* 2003;24:181-94.
- [70] Wang Y, Liu L, Guo S. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro. *Polymer Degradation and Stability* 2010;95:207-213.

- [71] Pan L, Pei X, He R, Wan Q, Wang J. Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 2012;93:226-34.
- [72] Sahithi K, Swetha M, Ramasamy K, Srinivasan N, Selvamurugan N. Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 2010;46:281-3.
- [73] Venkatesan J, Qian Z, Ryu B, Kumar N, Kim S. Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan – natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 2011;83:569-577.
- [74] Jitianu A, Cacciaguerra T, Benoit R, Delpeux S, Béguin F, Bonnamy S. Synthesis and characterization of carbon nanotubes–tio₂ nanocomposites. *Carbon* 2004;42:1147-1151.
- [75] Peigney A, Laurent C, Flahaut E, Rousset A. Carbon nanotubes in novel ceramic matrix nanocomposites. *Ceramics International* 2000;26:677-683.
- [76] Neelgund G, Olurode K, Oki A. A simple and rapid method to graft hydroxyapatite on carbon nanotubes. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 2011;31:1477-1481.
- [77] Shin U, Yoon I, Lee G, Jang W, Knowles J, Kim H. Carbon nanotubes in nanocomposites and hybrids with hydroxyapatite for bone replacements. *Journal of Tissue Engineering* 2011;2011:674287.
- [78] Cho J, Boccaccini A, Shaffer M. Ceramic matrix composites containing carbon nanotubes. *Journal of Materials Science* 2009;44:1934-1951.
- [79] Mo C, Cha S, Kim K, Lee K, Hong S. Fabrication of carbon nanotube reinforced alumina matrix nanocomposite by sol–gel process. *Materials Science and Engineering: A* 2005;395:124-128.
- [80] Ahmad K, Pan W. Hybrid nanocomposites: a new route towards tougher alumina ceramics. *Composites Science and Technology* 2008;68:1321-1327.

- [81] Hahn B, Lee J, Park D, Choi J, Ryu J, Yoon W, Lee B, Shin D, Kim H. Mechanical and in vitro biological performances of hydroxyapatite-carbon nanotube composite coatings deposited on ti by aerosol deposition. *Acta Biomaterialia* 2009;5:3205-14.
- [82] Balani K, Anderson R, Laha T, Andara M, Tercero J, Crumpler E, Agarwal A. Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro. *Biomaterials* 2007;28:618-24.
- [83] Lee H, Shin U, Won J, Kim H. Preparation of hydroxyapatite–carbon nanotube composite nanopowders. *Materials Letters* 2011;65(2):208-211.
- [84] Ma P. Scaffolds for tissue fabrication. *Materialstoday* 2004:30-40.
- [85] Geng Y, Hutmacher D, Feng L., Fuh J. Rapid prototyping of 3d scaffolds for tissue engineering using a four-axis multiple-dispenser robotic system I. *Concurrent Engineering* 2003:423-432.
- [86] Hollister S. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials* 2005;4:518-524.
- [87] Sachlos E, Czernuszka J. Making tissue engineering scaffolds work. review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells & Materials* 2003;5:29-40.
- [88] Landers R, Hübner U, Schmelzeisen R, Mülhaupt R. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials* 2002;23(23):4437-47.
- [89] Yonemori K, Matsunaga S, Ishidou Y, Maeda S, Yoshida H. Early effects of electrical stimulation on osteogenesis. *Bone* 1996;19:173-80.
- [90] Marino A. Direct current and bone growth n.d.
- [91] Griffin M, Bayat A. Electrical stimulation in bone healing : critical analysis by evaluation levels os evidence. *Open Access Journal of Plastic Surgery*. 2011;11.

- [92] Pickering S, Scammell B. Electromagnetic fields for bone healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 2002;1:152-60.
- [93] Ercan B, Webster T. The effect of biphasic electrical stimulation on osteoblast function at anodized nanotubular titanium surfaces. *Biomaterials* 2010;31:3684-93.
- [94] Kim I, Song J, Zhang Y, Lee T, Cho T, Song Y, Kim D, Kim S, Hwang S. Biphasic electric current stimulates proliferation and induces vegf production in osteoblasts. *Biochimica Et Biophysica Acta* 2006;1763:907-16.
- [95] Huang C, Chen X, Chen Z. Osteocyte: the impresario in the electrical stimulation for bone fracture healing. *Medical Hypotheses* 2008;70:287-90.
- [96] Gan J, Fredericks C, Glazer P. Direct current and capacitive coupling electrical stimulation upregulates osteopromotive factors for spinal fusions. *Orthop J Harvard Med School* 2006;6:57-59.
- [97] Meynen V, Cool P, Vansant E. Verified syntheses of mesoporous materials.pdf. *Microporous and Mesoporous Materials* 2009;125:170-223.
- [98] Elmer P. Thermogravimetric analysis (tga) a beginner ' s guide n.d.
- [99] Crawford A, Silva E, York K, Li C. Raman spectroscopy : a comprehensive review n.d.
- [100] Beaupied H, Lespessailles E, Benhamou C. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. *Joint, Bone, Spine* 2007;74:233-9.
- [101] Kokubo T, Takadama H. How useful is sbf in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 2006;27(15):2907-15.
- [102] Kim H, Himeno T, Kawashita M, Kokubo T, Nakamura T. The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment. *Journal of the Royal Society Interface* 2004;1:17-22.

- [103] Kister G, Cassanas G, Bergounhon M, Hoarau D, Vert M. Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of d,l-lactide-co- ϵ -caprolactone by raman spectroscopy. *Polymer* 2000;41:925-932.
- [104] Antonakos A, Liarokapis E, Leventouri T. Micro-raman and ftir studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials* 2007;28(19):3043-54.
- [105] Gibson I, Best S, Bonfield W. Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999;44:422-8.
- [106] Elzubair A, Elias C, Suarez J, Lopes H, Vieira M. The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. *Journal of Dentistry* 2006;34:784-9.
- [107] Eswaraiah V, Sankaranarayanan V, Ramaprabhu S. Inorganic nanotubes reinforced polyvinylidene fluoride composites as low-cost electromagnetic interference shielding materials. *Nanoscale Research Letters* 2011;6:137.
- [108] Buang N, Fadil F, Majid Z, Shahir S. Characteristic of mild acid functionalized multiwalled carbon nanotubes towards high dispersion with low structural defects. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2012;7:33-39.
- [109] Bacáková L, Filová E, Rypáček F, Svorčík V, Starý V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological Research* 2004;53:35-45.
- [110] Bacakova L, Grausova L, Vacik J, Kromka A, Biederman H, Choukourov A, Stary V. Nanocomposite and nanostructured carbon-based films as growth substrates for bone cells. In: *Advances in diverse industrial applications of nanocomposites*. n.d.
- [111] Bacakova L, Grausova L, Vacik J, Fraczek A, Blazewicz S, Kromka A, Vanecek M, Svorcik V. Improved adhesion and growth of human osteoblast-like mg 63 cells on biomaterials modified with carbon nanoparticles. *Diamond and Related Materials* 2007;16:2133-2140.